

Metylaatioprofiloinnin vaikutus atyyppisten meningeomien riskiluokitukseen

Biologia, fysiologia ja genetiikka
pro gradu -tutkielma

Laatija:
Ville Sannikka

12.3.2025
Turku

Pro gradu -tutkielma

Oppiaine: Biologia, fysiologia ja genetiikka

Tekijät: Ville Sannikka

Otsikko: Metylaatioprofiloinnin vaikutus atyyppisten meningeomien riskiluokitukseen

Ohjaajat: LT, dos., Veli Kairisto, LL Eva-Maria Talvitie, FM Jenni Tuominen, FT Heidi Viitaniemi

Sivumäärä: 69 sivua

Päivämäärä: 12.3.2025

Meningeoomat ovat yleisimpiä primaarisia kallonsisäisiä kasvaimia ja ne saavat todennäköisesti alkunsa lukinkalvon meningoteliaalisesta solukosta. Meningeoomat aiheuttavat kasvaimen sijainnista riippuen erilaisia, vakavuusasteeltaan vaihtelevia neurologisia oireita. Meningeoomat jaetaan kolmeen eri graduukseen, joista graduksen 1 kasvaimet ovat hyvälaatuisia ja hitaasti kasvavia, mutta graduksen 2 ja 3 kasvaimet ovat aggressiivisempia ja uusiutuvat herkemmin. Graduksen 2 atyyppisten meningeomien uusiutumisriskin ennustaminen on erittäin hankalaa pelkästään histologian perusteella, johon nykyiset Maailman terveysjärjestön WHO:n suositukset pohjautuvat. Metylaatiostatuksen määrittäminen mahdollistaa entistä tarkemman uusiutumisriskin ennustamisen atyyppisille meningeoomille.

Tässä tutkielmassa selvitettiin retrospektiivisesti metylaatioluokka (Ben 1–3, Int A/B tai Mal) 17:lle Turun yliopistollisessa keskussairaalassa leikatulle atyyppiselle meningeoomalle. Metylaatioluokka määritettiin kasvainten metylaatiostatuksen sekä kopiolumuutosten avulla. Metylaatiostatuksen selvittämiseen käytettiin Heidelbergin yliopistollisen sairaalan (UKHD), Hopp:n lasten syöpäkeskuksen Heidelberg (KITZ) ja Saksan syöpätutkimuskeskuksen (DKFZ) kehittämää ja ylläpitämää Brain Classifier -luokittelualgoritmia. Kopiolumuutokset tutkittiin R ohjelmistolla conumee 2.0-paketilla. Tutkielma toimii osana käytettävän menetelmän validointia Tyks genomiikan laboratorion käyttöön ja osana tutkielmaa tehtiin myös ISO 15189:2022 mukainen prospektiivinen riskienarviointi.

Tutkielmassa todettiin, että 47 % näytteistä kuuluu matalamman uusiutumisriskin metylaatioluokkiin ja 53 % korkeamman uusiutumisriskin metylaatioluokkiin. Matalamman uusiutumisriskin näytteissä ei havaittu kromosomi 22q alimäärän lisäksi juurikaan muita kopiolumuutoksia, kun taas korkeamman uusiutumisriskin näytteissä havaittiin lukuisia kopiolumuutoksia, joista merkittävimpiä olivat kromosomien 1p ja 22q alimäärät. Euroopan neuro-onkologian yhdistyksen suositusten perusteella matalan uusiutumisriskin potilaiden seuranta voidaan harventaa, mikä koskisi puolta tämän tutkimuksen aineiston potilaista.

Avainsanat: Atyyppinen meningeooma, metylaatioprofilointi, metylaatioluokitus, kopiolumuutos

Sisällysluettelo

1	Johdanto	5
1.1	DNA:n metylaatio	5
1.2	Kopiolukumuutokset	7
1.3	Meningeooma	7
1.4	Atyyppinen meningeooma	9
1.5	Tekoäly ja sen etiikka lääketieteessä	10
1.6	Illumina Infinium EPIC v2 BeadChip –mikrosiru	12
1.7	Tutkielman tarkoitus	13
2	Aineisto ja menetelmät	14
2.1	DNA:n pitoisuuden määrittäminen ja laimentaminen	15
2.2	Bisulfiittikonversio	16
2.3	Metylaatioprofilointi Illumina Infinium EPIC v2 BeadChip –mikrosirulla	17
2.3.1	DNA:n monistaminen	17
2.3.2	DNA:n pilkkominen ja saostus	18
2.3.3	DNA:n hybridisaatio mikrosirulle	19
2.3.4	Mikrosirun pesu	19
2.3.5	Ekstensio ja värjäys	20
2.3.6	Mikrosirun pesu, päällystäminen ja kuvaus	21
2.4	Datan käsittely	21
2.4.1	Laadunvarmistus	21
2.4.2	Metylaatioanalyysit	22
2.5	Prospektiivinen riskianalyysi	23
2.6	Tekoälyn käyttö tutkielmassa	24
3	Tulokset	26
3.1	Brain Classifier -luokittelualgoritmin tulosten tulkinta	26
3.2	Matalan uusiutumISRiskin metylaatioluokat ovat kopiolukumuutoksiltaan vähäisiä	28
3.3	Kohtalaisen uusiutumISRiskin metylaatioluokkia yhdistää laajemmat kopiolukumuutokset	31
3.4	Metylaatioluokat klusteroituvat erilleen toisistaan	34

4	Johtopäätökset	36
4.1	Menetelmän validointi	36
4.2	Metylaatioluokituksen epätarkkuus voi johtua monesta syystä	37
4.3	Metylaatiotutkimuksen kliininen merkitys meningeomassa	38
4.4	Eettiset näkökulmat meningeomien luokittelusta tekoälyn avulla	40
4.5	Yhteenveto	41
5	Kiitokset	42
	Lähteet	43
	Liitteet	48
	Liite 1. Kopolukuanalyysin R-komennot	48
	Liite 2. Bening-metylaatioluokan kopolukumuutokset	51
	Liite 3. Intermediate-metylaatioluokkien kopolukumuutokset	55
	Liite 4. ISO15189:2022 mukainen prospektiivinen riskianalyysi	60

1 Johdanto

Tässä tutkielmassa selvitetään metylaatioluokka 17:lle atyyppiselle meningeomalle Brain Classifier -luokittelualgoritmin ja kopiolukuanalyysin avulla, ja menetelmä validoidaan Turun yliopistollisen keskussairaalan (Tyks) genomiikan laboratorion rutiinidiagnostiikan käyttöön. Tähän asti metylaatioprofilointitutkimukset on tehty ulkoistettuna Tanskassa. Jotta tutkimusmenetelmä voidaan ottaa käyttöön, se on validoitava laboratoriossa, sillä tutkielmassa käytettävä Illuminan EPIC v2- mikrosirumenetelmä ei ole CE-IVD menetelmä. Tämä tarkoittaa, ettei Illumina ole validoinut menetelmää sellaisenaan *in vitro* diagnostiikassa käytettäväksi. Atyyppisten meningeomien metylaatioprofilointianalytiikkaa ei ole aikaisemmin tehty Suomessa.

1.1 DNA:n metylaatio

Epigeneettiset mekanismit muokkaavat geenien ilmenemistä ilman, että geenisekvenssi muuttuu. Epigeneettisiä säätelymekanismeja ovat muun muassa histonien muokkaaminen esimerkiksi asetylaatiolla, fosforylaatiolla tai metylaatiolla, kromatiinin pakkaaminen inaktiiviseksi heterokromatiiniksi ja DNA:n metylaatio, joka on yksi yleisimmistä epigeneettisistä geenihiljentämismekanismeista. DNA:n metylaatio liittyy moniin eri toimintoihin, kuten geeniekspresioon, toisen vanhemmalta saadun alleelin inaktivaatioon eli perimän leimautumiseen, X-kromosomin inaktivaatioon, transposonien eli liikkuvien elementtien hiljentämiseen sekä useisiin eri tauteihin kuten kasvaimiin ja kehityshäiriöihin. DNA:n metylaatio voidaan karkeasti jakaa kahteen eri kategoriaan, ylläpitävään metylaatioon sekä *de novo* metylaatioon. (Tollefsbol, 2023)

DNA:n metylaatio tapahtuu pääasiassa DNA-metyylitransferaasi (DMNT) -entsyymien avulla, jotka kiinnittävät metyyliryhmän sytosiinin viidenteen hiiliryhmään (5-metyylisytosiini, 5mc) (Moore ym., 2012). Eri DNA-metyylitransferaasit toimivat eri tavalla. *DMNT1*-geenin koodaama DMNT1 toimii pääasiassa ylläpitävässä metylaatioissa. Ylläpitävä metylaatio tarkoittaa sitä, että DNA:n replikoituessa alkuperäiseen juosteeseen jää metyyliryhmä, kun taas uuteen

syntetisoituun DNA-juosteeseen ei liity automaattisesti metyyliryhmää. DMNT1 etsii näitä hemimetyloituneita kohtia ja liittää uuteen syntetisoituun vastinjuosteeseen uuden metyyliryhmän. DMNT1:n apuna toimii UHFR1-proteiini, joka ohjaa DMNT1:n hemimetyloituneisiin kohteisiin. Täysin uusien metyyliryhmien liittämistä eli *de novo* metylaatiosta vastaa *DMNT3A*- ja *DMNT3B*-geenien koodaamat DMNT3A ja DMNT3B proteiinit, jotka liittävät metyyliryhmiä mieluiten CpG dinukleotidisekvensseihin, mutta myös CpA ja CpT sekvensseihin. (Tollefsbol, 2023).

Suurin osa, 60–80 %, DNA:n metylaatiosta esiintyy sytosiineissa, joita seuraa guaniini, eli CpG-dinukleotidisekvensseissä (Moore ym., 2012; Tollefsbol, 2023). CpG-dinukleotidisekvenssejä esiintyy harvaan ihmisen genomissa, lukuun ottamatta CpG-saarekkeita, joissa dinukleotidisekvenssi toistuu useasti peräkkäin (Moore ym., 2012). CpG-saarekkeet määritellään yli 200 emäsparia pitkinä alueina, joissa C+G nukleotideja on yli 50 % (Portela & Esteller, 2010). CpG-saarekkeita esiintyy etenkin geenien promoottorialueiden yhteydessä ja näiden saarekkeiden metylaatio on yksi yleisimmistä epigeneettisistä geeninsäätelymenetelmistä (Lahtz & Pfeifer, 2011; Moore ym., 2012). CpG-saarekkeen metylaation jälkeen transkriptiotekijöiden ja RNA-polymeraasin kiinnittyminen promoottorialueelle estyy, jolloin geeninluku myös estyy (Chen ym., 2017). CpG-saarekkeiden metylaation lisäksi geenien säätelyä tapahtuu CpG-saarekkeiden ”rantojen” (CpG island shore) eli CG-sisällöltään pienempien ja saarekkeesta kahden kiloemäksen säteellä olevien alueiden metylaatiolla (Portela & Esteller, 2010).

Koko genomin metylaatiostatuksen eli metylomin selvittämisen myötä on huomattu, että muutokset metylaatiostatuksessa linkittyvät useisiin eri tauteihin, kuten syöpiin (Chen ym., 2017). Syövässä metylomista on havaittu kahdenlaista DNA:n metylaatiota; kromosomien laajuista, globaalia hypometylaatiota, eli normaalin metylaation häviämistä, joka johtaa kromosomien epävakauteen sekä CpG-saarekkeiden hypermetylaatiota, eli normaalia suurempaa metylaatiota, joka johtaa geenien ilmenemisen muutoksiin (Urbano ym., 2019). Esimerkiksi tuumorisuppressorigeenien ja solusykliä säätelevien geenien hypermetylaatio edistää syövän syntyä, sillä näiden geenien normaali toiminta estyy hypermetylaation vuoksi. Myös lukuisten muiden geenien hypermetylaatio voi edistää syövän syntyä, jos kyseisillä geneilla on syövältä suojaavia ominaisuuksia (Urbano ym., 2019). Syövässä metylomin on todettu todennäköisesti koos-

tuvan alkuperäisen solun metylaatiosta ja syövän kehittymisen aikana hankituista metylaatioista. Täten tiettyjen kaavojen (pattern) havaitseminen metylomissa mahdollistaa eri syöpien ja eri tautien tunnistamisen toisistaan, sillä metylomin on todettu pysyvän hyvin vakaana taudin kehittymisestä huolimatta (Fernandez ym., 2011; Pajtler ym., 2015).

1.2 Kopolukumuutokset

Kopolukumuutokset ovat kokonaisten kromosomien tai niiden osien monistumia tai häviämiä (ylimäärä ja alimäärä). Kopolukumuutokset syntyvät monien eri solunsisäisten mekanismien kautta, kuten DNA:n rekombinaatiossa, monistumisessa tai korjauksessa tapahtuvien virheiden kautta (Pös ym., 2021). Ihmisen genomissa esiintyy normaalitilanteessa pieniä kopolukumuutoksia, mutta osa kopolukumuutoksista on haitallisia ja ne on yhdistetty muun muassa syöpiin ja kasvaneeseen syöpäalittiuteen (Hastings ym., 2009). Beroukhim ym. (2010) totesivat tutkimuksessaan, että syövässä keskimäärin 17 % genomista on ylimääräistä ja 16 % on alimääräistä, mikä on merkittävä ero heidän määrittämiinsä normaalin genomien yli- ja alimääräisiin (0.35 % ja <0.1 %). Kopolukumuutoksia esiintyy koko genomissa laajuisesti, jolloin ne osuvat myös geenien koodaaville alueille. Häviämä geenin alueella johtaa siihen, ettei proteiinia tuoteta tarpeeksi, kun taas kahdentuma voi johtaa lisääntyneeseen proteiinituotantoon. Kopolukumuutoksien vuoksi geenit voivat myös katketa, jolloin syntyy mahdollisesti toimimattomia proteiineja. Kaikki edellä mainitut vaihtoehdot johtavat merkittäviin muutoksiin solun toiminnossa. (Pös ym., 2021)

1.3 Meningeooma

Meningeoomat eli aivokalvokasvaimet ovat yleisimpiä primaarisia kallonsisäisiä kasvaimia. Ne saavat todennäköisesti alkunsa lukinkalvon (arachnoid mater) meningoteliallisesta solukosta (Sahm ym., 2021). Lukinkalvo on kallon alla sijaitseva seitinomainen verisuoneton kalvo, joka koostuu kahdesta eri kerroksesta (Adeeb ym., 2013). Ulompi mesoteelinen kerros on litteistä ja tiiviisti toisissaan kiinni olevista soluista koostuva kerros, ja sisempi kerros koostuu harvemmassa olevista soluista, jotka eivät ole yhtä litteitä kuin ulomman kerroksen solut (Adeeb ym., 2013).

Meningeomien yleisin riskitekijä on ionisoiva säteily ja riski meningeooman kehittymiselle on suurempi, jos on altistunut säteilylle lapsuudessa (Sahm ym., 2021). Aikaisemmissa tutkimuksissa on osoitettu myös matalien säteilyannosten, esimerkiksi pään tietokonetomografiakvaamisen, nostavan riskiä meningeooman kehittymiselle (Sahm ym., 2021). Ionisoivan säteilyn lisäksi myös sukupuolihormonihoitojen, etenkin progesteroni- eli keltarauhashormonihoitojen, on todettu linkittyvän korkeampaan meningeoomariskiin (Sahm ym., 2021; Ichwan ym., 2023).

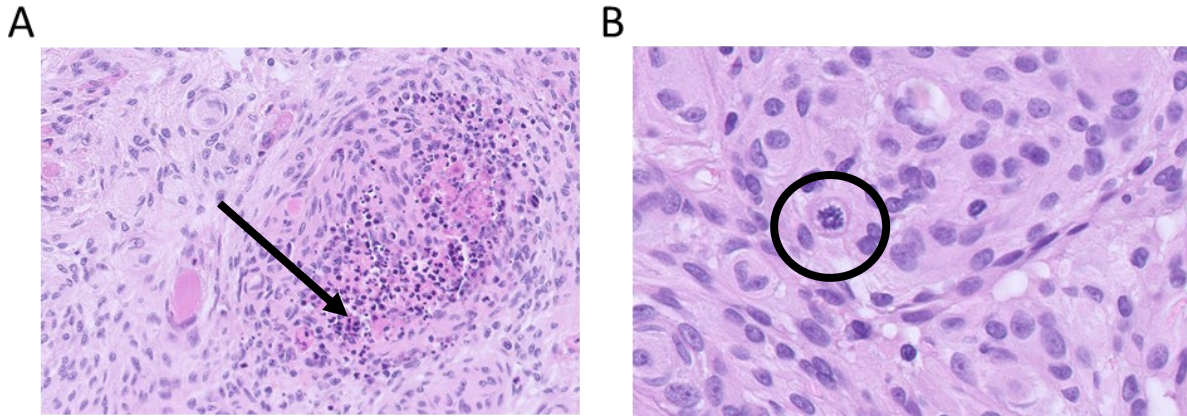
Meningeoomat voivat sijaita kallon kaikissa osissa, mutta esiintyvät useimmiten isoivojen pinnalla ja parasagittaalisella alueella. Meningeooma voi kallon lisäksi esiintyä selkärangassa. Meningeooma voi aiheuttaa neurologisia oireita painaessaan viereisiä rakenteita (Sahm ym., 2021). Oireet vaihtelevat kasvaimen sijainnin mukaan, esimerkiksi parasagittaalisella alueella kasvavan meningeooman ensioire voi olla epileptinen kohtaus, kun taas aivosirpin alueella sijaitsevan meningeooman oireena voi olla pääkipu, muutokset näkökyvyssä, muutokset persoonallisuudessa tai dementia (Marosi ym., 2008). Meningeoomat ovat yleensä hitaasti kasvavia kasvaimia (Sahm ym., 2021).

Maailman terveysjärjestön (World Health Organization, WHO) keskushermoston kasvaimien luokittelun viidennen painoksen (2021) mukaan meningeoomat jaetaan kolmeen eri luokkaan eli graduksen ja viiteentoista eri alatyypin (Sahm ym., 2021). Graduksen 1 kasvaimet ovat yleensä hyvänlaatuisia eivätkä uusiudu, graduksen 2 kasvaimet ovat kasvultaan graduksen 1 kasvaimia aggressiivisempia ja niillä on korkeampi uusiutumiseriski ja graduksen 3 kasvaimet ovat aggressiivisia ja niillä on korkea uusiutumiseriski (Sahm ym., 2021). Yleisimpiä ovat graduksen 1 meningeoomat (80–85 % tapauksista), toiseksi yleisimpiä ovat graduksen 2 meningeoomat (15–20 % tapauksista) ja harvinaisimpia ovat graduksen 3 meningeoomat, joita esiintyy 1–2 % tapauksista (Maggio ym., 2021).

1.4 Atyyppinen meningeooma

Atyyppiset meningeoomat luokitellaan WHO:n luokituksen mukaan graduksen 2 kasvaimiin (Sahm ym., 2021). WHO:n luokittelun mukaan atyyppisen meningeooman histologisina tunnuspiirteinä ovat kasvaimen leviäminen aivokudokseen, 4–19 mitoosin löytäminen 40x suurennoksella kymmenestä peräkkäisestä HPF:stä (high-power field, 0.16 mm²) (kuva 1B) sekä vähintään kolme seuraavista: spontaani nekroosi (kuva 1A), selkeästi erottuvat tumajyväset, korkea solukkuus, pieni solukoko sekä mattomainen kasvutapa (Sahm ym., 2021). Atyyppisen meningeooman diagnoosiin riittää joko kasvanut mitoosien määrä tai invaasio aivokudokseen tai kolme edellä mainittua histologista muutosta (Sahm ym., 2021). Atyyppisten meningeoomien uusiutumisen ennustaminen histologian perusteella on kuitenkin hankalaa. Atyyppisten meningeoomien tarkempaa tunnistamista varten onkin kehitetty tarkempia menetelmiä, kuten yksittäisten geenien mutaatioiden, sytogeneettisten muutosten ja genomilaajuisten metylaation tutkiminen ja näiden yhdistäminen diagnoosia varten (Marastoni & Barresi, 2024).

Sytogeneettisistä muutoksista yleisin on kromosomin 22 q-käsivarren monosomia (Sahm ym., 2021). Kromosomin 22q monosomiaan usein yhdistyy myös muutokset *NF2*-tuumorisuppressorigeenissä, johtaen bialleeliseen inaktivaatioon, jolloin heterotsygotian menetyksen (LOH, Loss-of-heterozygosity) vuoksi käytössä on vain toinen, toimimaton geenikopio (Pećina-Šlaus, 2013; Halabi ym., 2023) Toinen merkittävä kopiolumuutos atyyppisessä meningeoomassa on kromosomin 1p alimäärä, joka yhdessä 22q alimäärän kanssa on yhdistetty korkeampaan uusiutumisen riskiin (Sahm ym., 2017; Maas ym., 2021). Myös muiden kromosomien, kuten 2p, 4p, 7p, 10q, 14q, 18q, alimäärät on yhdistetty korkeampaan uusiutumisen riskiin (Maas ym., 2021). Kromosomien alimäärän lisäksi atyyppisissä meningeoomissa voi esiintyä myös tiettyjä ylimääriä. Atyyppisissä meningeoomissa esiintyy esimerkiksi kromosomin 5 ylimäärä, on yhdistetty hyvälaatuisempaan atyyppiseen meningeoomaan (Sahm ym., 2017).



Kuva 1 Histologinen kuva atyyppisestä meningeomasta 40x suurennoksella. Kuvissa spontaania nekroosia (A) ja mitoosi (B).

Kopiolukumuutosten lisäksi atyyppisiä meningeomia voidaan luokitella määrittämällä genomilaajuinen metylaatiostatus. Sahm ym. (2017) selvittivät tutkimuksessaan meningeomien jakautuvan kahteen eri ryhmään ja ryhmien sisäisesti kuuteen eri luokkaan niiden metylaatio-profiilin perusteella. Luokittelussa näytteiden annettiin klusteroitua valvomatta euklidisen etäisyyden ja Wardin klusterointimenetelmän avulla (Sahm ym., 2017). Molekulaaristen muutosten ja kliinisten tietojen perusteella kolme metylaatioluokkaa, Ben-1, Ben-2 ja Ben-3 sisälsivät hyvälaatuiset ja matalan uusiutumisriskin (benign) kasvaimet, kaksi metylaatioluokkaa Int-A ja Int-B sisälsivät kohtalaisen riskin (intermediate) kasvaimet, ja Mal-metylaatioluokka (malignant) sisälsi pahanlaatuiset kasvaimet, joilla on korkein uusiutumisriski (Sahm ym., 2017). Näistä metylaatioluokista atyyppiset meningeomat kuuluvat yleensä Int-A ja Int-B luokkiin, mutta noin 23 % tapauksista kuuluu Ben-1 luokkaan (Sahm ym., 2017).

1.5 Tekoäly ja sen etiikka lääketieteessä

Tekoäly eli keinoäly määriteltiin ensimmäisen kerran vuonna 1955 tieteenalaksi, jonka tavoitteena on kehittää älykkäitä koneita. Lääketieteessä tekoälyn määritelmä sisältää valtavan määrän eri osa-alueita, jotka voidaan jakaa kahteen erilliseen kategoriaan: virtuaaliseen ja fyysiseen osaan. Fyysinen osa kattaa alleen muun muassa robotiikan ja erilaiset lääkinnälliset sensorit, kun taas virtuaalinen osa sisältää muun muassa koneoppimisen ja siihen pohjautuvat algoritmit. (Hamet & Tremblay, 2017)

Koneoppiminen tarkoittaa algoritmia, joka voi oppia siihen syötetystä datasta. Koneoppiminen voidaan jakaa kahteen eri osa-alueeseen, valvottuihin ja valvomattomiin algoritmeihin. Näiden erona on se, että valvotuissa algoritmeissa käytettävä opetusdata sisältää ominaisuuksien (engl. features) lisäksi tavoitearvot (engl. labels), joiden mukaan algoritmi oppii yhteydet ominaisuuksien ja tavoitearvojen välillä. Valvomattomissa algoritmeissa tavoitearvoja ei ole ja data sisältää vain ominaisuudet. Valvottuja ja valvomattomia koneoppimisalgoritmeja käytetään niiden eroavaisuuksien mukaan eri tarkoituksiin, valvottujen algoritmien avulla kyetään esimerkiksi luokittelemaan dataa eri kategorioihin ominaisuuksien ja tavoitearvojen mukaisesti, kun taas valvomattomien algoritmien avulla kyetään klusteroimaan dataa useiden ominaisuuksien perusteella. (Goodfellow ym., 2016)

Lääketieteessä koneoppimista voidaan hyödyntää lukuisissa eri sovelluksissa. Koneoppimista voidaan hyödyntää esimerkiksi sydän- ja verisuonitautien riskien arvioinnissa, kuvien ja kudosteikkien analyysissä, sekä kasvainten luokittelussa (Capper ym., 2018a; Rajkomar ym., 2019). Koneoppiminen vaikuttaa kliinikoiden työhön laajasti, kuten esimerkiksi prognoosin eli ennusteen ja diagnoosin laatimisessa (Rajkomar ym., 2019). Koneoppimisalgoritmien perusteella kyetään luokittelemaan eri meningeomia eri metylaatioluokkiin, kuten Capper ym. (2018a) esittelevät julkaisussaan. Luokittelualgoritmit muuttavat neuropatologien työnkuvaa merkittävästi prognoosin ja diagnoosin määrittämisessä, sillä algoritmit mahdollistavat entistä tarkemman kasvainten luokittelun.

Tekoälyn käyttöön lääketieteessä liittyy kolme isoa eettistä kysymystä: läpinäkyvyys (engl. transparency), vastuu (engl. accountability) sekä valvonta (engl. governance) (Chauhan & Gullapalli, 2021). Läpinäkyvyys tekoälyn käyttöön tarkoittaa esimerkiksi sitä, että tekoälyalgoritmiin liittyvät tiedot, kuten koulutusdata, on avoimesti nähtävillä ja saatavilla (Chauhan & Gullapalli, 2021). Vastuu liittyy vahvasti läpinäkyvyyteen tekoälyn eettisessä arvioinnissa (Chauhan & Gullapalli, 2021). Vastuu tässä kontekstissa tarkoittaa sitä, kuka on vastuussa kenelle ja mistä asiasta hän on vastuussa (Kroll, 2020). Lääketieteessä tekoälymenetelmien vastuun kantamiseen on hyvä olla dokumentoitu hierarkia, jossa ilmenee, kuka on vastuussa mistä päätöksestä kenelle (Chauhan & Gullapalli, 2021). Vastuu on tärkeä osa tekoälymenetelmien

eettisyyden pohtimisessa, sillä vastuun kantoa korostamalla voidaan luoda myös edellytykset tekoälymenetelmien valvonnalle (Kroll, 2020). Tekoälymenetelmien valvontaa tulee tehdä kansallisella tasolla sekä instituutiotasolla, sillä tekoälymenetelmien uskotaan muuttavan lääketiedettä ja terveydenhuoltoa merkittävästi, jolloin on kriittistä valvoa tätä kehitystä esimerkiksi datan väärinkäytön estämiseksi. Euroopan unionissa henkilötietojen valvontaan on säädetty Yleinen tietosuojaja-asetus, GDPR (engl. General Data Protection Regulation), joka asettaa tarkat vaatimukset henkilötietojen keräämiselle, säilytykselle ja hallinnoinnille (Chauhan & Gullapalli, 2021).

1.6 Illumina Infinium EPIC v2 BeadChip –mikrosiru

Illuminan Infinium EPIC v2 BeadChip -mikrosirulla voidaan selvittää epigenomin metylaatiostatus. Illuminan BeadChip mikrosirut sisältävät nimensä mukaisesti mikrohelmiä, jotka toimivat alustana oligoille, jotka tunnistavat spesifejä CpG-kohtia Infinium-kemian perusteella. Illuminan Infinium -tekniikkaan perustuva metylomin tutkiminen on ollut yksi käytetyimmistä tutkimusmenetelmistä epigenomitutkimuksissa (Kaur ym., 2023). Illuminan Infinium-kemia mahdollistaa metylaation tutkimisen halutuilta CpG-lokuksilta. Yksi Infinium-helmi tunnistaa yhden CpG-kohteen ja yhden emäksen ekstension avulla havaitaan, onko CpG-kohde metyloitunut vai ei. Metyloitunut kohde on bisulfiittikäsittelyn jälkeen pysynyt sytosiinina ja metyloimaton kohde on muokkautunut käsittelyssä sytosiinista tymiiniksi (Bibikova ym., 2011). Yhden emäksen ekstensiossa tapahtuneen fluoresenssileiman avulla pystytään havaitsemaan ja erittelemään ne kohteet, jotka ovat metyloituneet niistä, jotka eivät ole (Kaur ym., 2023).

EPIC v2 on uusin vuonna 2021 julkaistu metylaatiostatuksen määrittämiseen käytettävä mikrosiru Illuminalta. EPIC v2 mikrosiru sisältää 937,690 CpG-kohdetta, joka on huomattavasti enemmän kuin edeltäjillään EPIC v1-mikrosirulla (866 552 kohdetta) tai HM450-mikrosirulla (486 427 kohdetta) (Kaur ym., 2023).

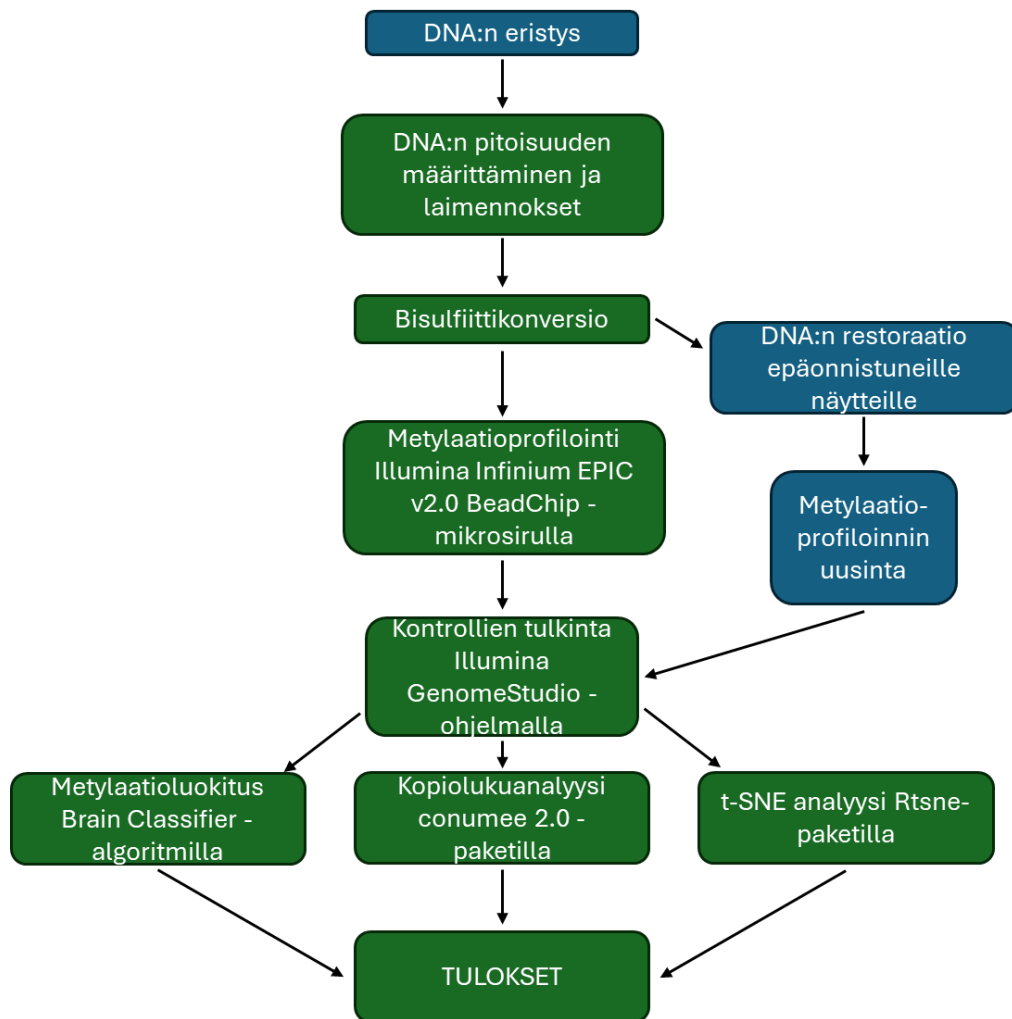
1.7 Tutkielman tarkoitus

Tämän tutkielman tarkoituksena on tutkia metylaatioprofiloinnin avulla atyyppisten meningeomien jakautumista eri ennusteellisiin luokkiin sekä selvittää kasvainten kopiolumuutosten suhdetta metylaatioluokittelijan tuloksiin. Tutkielma tukee ja täydentää Tyks genomiikan laboratorion tekemää metylaatioprofilointimenetelmän validaatiota ja käyttöönottoa. Tutkielman ja validoinnin tavoitteena on metylaatioprofiloinnin kattava hyödyntäminen meningeomien diagnostiikassa.

2 Aineisto ja menetelmät

Tutkielman aineistona on vuosina 2022–2024 Tyks:ssa leikatut atyyppiset meningeoomat, joiden formaliinifiksoiduista (FFPE) kudosleikkeistä on eristetty DNA. DNA oli eristetty QIAGEN QiaAmp DNA FFPE Advanced UNG-kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Pro gradu tutkielman tekoon on kuulunut tutkielman tekijän tekemien työvaiheiden lisäksi Tyks genomiikan laboratoriohenkilökunnan tekemiä työvaiheita. Eri tekijöiden työvaiheet ovat selkeyden vuoksi kuvattuna, kuten myös tutkielman eteneminen (kuva 2). Tyks genomiikan laboratoriohenkilökunta teki uusinnat kolmelle näytteelle, joiden GenomeStudiolla tehdyssä laadunvarmistuksessa havaittiin, että bisulfiittikonversio oli epäonnistunut. Näiden lisäksi myös kaksi näytettä uusittiin DNA:n laimentamisesta alkaen Tyks genomiikan laboratoriohenkilökunnan toimesta, sillä näiden Brain Classifier-luokittelualgoritmin antamat tulokset eivät täyttäneet luotettavaan metylaatioluokan tunnistamiseen vaadittavaa 50 %:n tarkkuusvaatimusta. Epäonnistuneille näytteille tehtiin myös bisulfiittikonversion jälkeen entsymaattinen korjaus Illuminan HD FFPE DNA restore-kitillä. Kitissä toimii kaksi entsyymiä, jotka korjaavat bisulfiittikonversion aikana tulleet DNA:n vauriot. Toinen entsyymeistä korjaa vaurioituneet nukleotidit vastinjuosteen avulla ja toinen entsyymi liittää korjatut nukleotidit paikalleen.



Kuva 2 Tutkielmassa tehdyt työvaiheet. Sinisellä on kuvattu Tyks genomiikan laboratoriohenkilökunnan tekemä työ ja vihreällä gradun kirjoittajan tekemä työ

2.1 DNA:n pitoisuuden määrittäminen ja laimentaminen

Tutkielmassa aineistona on FFPE-näytteistä eristetty DNA. Eristetyn DNA:n pitoisuus määritettiin Qubit 3.0 -fluorometrillä käyttäen BroadRange (BR)-kittiä (Thermo Fisher Scientific), joka mittaa kaksijuosteiseen DNA:han sitoutuvan molekyylin fluoresenssia. DNA:n pitoisuuden määrittämistä varten valmistettiin kaksi standardia valmistajan ohjeiden mukaisesti. Standardit valmistettiin mittaukseen yhdistämällä 190 µl Qubit-puskuriliuosta ja 10 µl standardiliuosta 1 tai 2. Näytteet valmistettiin yhdistämällä 198 µl Qubit-puskuriliuosta ja 2 µl näytettä. Sekä standardeja että näytteitä inkuboitii pimeässä, huoneenlämmössä 2 minuuttia ennen niiden mittausta. Näytteet mitattiin duplikaattina ja laimennokseen käytettiin duplikaattimittauk-

sista saatua pienempää DNA-pitoisuutta riittävän DNA määrän takaamiseksi. DNA:n pitoisuuden määrittämisen jälkeen näytteet laimennettiin 20 µl:n siten, että DNA:n määrä oli 500 ng. Laimennettuja näytteitä säilytettiin +4°C yön yli.

2.2 Bisulfiittikonversio

Bisulfiittikonversio on yleisimmin käytetty menetelmä DNA:n metylaatiostatuksen määrittämisessä. Bisulfiittikonversiossa natriumvetysulfaatti (engl. sodium bisulfite) muokkaa metyloimattomat sytosiiniemäokset urasiileiksi, jotka PCR-ajossa jatkomuokkautuvat tyymiineiksi (Miyata ym., 2017). Bisulfiittikonversioon käytettiin Zymo Research:n EZ-96 DNA Methylation Lightning MagPrep -kittiä. Laimennettuihin näytteisiin lisättiin 130 µl Lightning conversion -reagenssia ja näytteet sekoitettiin pipetillä. Näytteet inkuboitiin PCR-laitteella (Applied Biosystems Veriti 96 well thermal cycler) +98°C:ssa 8 minuuttia ja +54°C:ssa 60 minuuttia. Näytteiden inkubaation aikana vorteksoitiin (Biosan Multi Plate Shaker MPS1) huolellisesti EZ-Methylation Magprep -helmet ja uudelle MIDI-levylle pipetoitiin 600 µl M-binding-puskuria ja 10 µl homogeenisiksi vorteksoituja magneettihelmiä. Näytteiden inkubaation jälkeen ne pipetoitiin edellä mainitulle MIDI-levylle magneettihelmi-binding-puskuri -seokseen, sekoitettiin hyvin ja levyä inkuboitiin 5 minuuttia huoneenlämmössä. Inkuboinnin jälkeen levy siirrettiin magneetille ja magneettihelmien annettiin asettua pelletiksi 5 minuutin ajan. Pelletöitymisen jälkeen supernatantti pipetoitiin pois koskematta muodostuneeseen helmipellettiin ja levy siirrettiin pois magneetilta. Näytteet resuspensoitiin 400 µl:aan M-wash-puskuria ja näytelevy siirrettiin magneetille 3 minuutin ajaksi, jonka jälkeen supernatantti pipetoitiin pois ja näytelevy siirrettiin magneetilta.

Näytteet desulfonoitiin 200 µl:lla L-Desulphonation-puskuria, joka sekoitettiin näytteisiin pipetoimalla näytteitä ylös muutaman kerran. Näytelevyä inkuboitiin huoneenlämmössä 20 minuutin ajan, jonka jälkeen se siirrettiin magneettilevylle 3 min ajaksi ja supernatantti pipetoitiin pois. Näytelevy poistettiin magneetilta ja magneettihelmet pestiin resuspensoimalla ne 400 µl:n M-wash-puskuria. Pesupuskurin lisäämisen jälkeen näytelevy siirrettiin magneettilevylle 3 min ajaksi, jonka jälkeen supernatantti pipetoitiin pois. Pesu toistettiin vielä toisen kerran, jonka

jälkeen näytelevy laitettiin lämpökaappiin (Hoefer Scientific Red Roller II hybridisation oven) kuivumaan +55°C:n 30 minuutin ajaksi.

Kuivattuihin pelletteihin lisättiin 25 µl M-elution-puskuria, joka sekoitettiin näytteisiin pipetoimalla. Näytelevyä inkuboitiin lämpökaapissa +55°C:ssa 4 minuutin ajan, jonka jälkeen se siirrettiin magneetille 1 minuutin ajaksi, jonka aikana magneettihelmet pelletöityivät. Supernatantia, joka sisälsi bisulfiittikonvertoidun DNA:n, pipetoitiin näytelevyltä 20 µl jatkotutkimuksia varten uudelle MIDI-levylle.

2.3 Metylaatioprofilointi Illumina Infinium EPIC v2 BeadChip –mikrosirulla

2.3.1 DNA:n monistaminen

Bisulfiittikonvertoitu DNA monistettiin isotermisellä amplifikaatiolla. Isotermisellä amplifikaatiolla DNA monistuu matalammassa lämpötilassa hitaammin ja pidemmissä pätkissä kuin esimerkiksi polymeerasiketjureaktiolla. Monistus tehtiin uudella MIDI-levyllä, jolle pipetoitiin 20 µl MA1-liuosta per näytekaivo. MA1-liuosta sisältäviin näytekaivoihin pipetoitiin 4 µl bisulfiittikonvertoitua DNA:ta sekä 4 µl tuoretta 0.1 M NaOH-liuosta. Näytelevy suojattiin silikonikannella ja vorteksoitiin 1600 rpm 1 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin alas (280 x g, Eppendorf Centrifuge 5430). Näytteitä inkuboitiin huoneenlämmössä 10 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin 68 µl RPM-liuosta sekä 75 µl MSM-liuosta. Näytelevy suojattiin silikonikannella ja vorteksoitiin 1600 rpm 1 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin alas. Näytteitä inkuboitiin +37°C:ssa hybridisaatiouunissa (Illumina Hybridization Oven) 20 tunnin ajan, jolloin bisulfiittikonvertoitu DNA monistui.

2.3.2 DNA:n pilkkominen ja saostus

DNA:n monistamisen jälkeen näytelevy sentrifugoitiin alas 280 x g ja näytteisiin pipetoitiin 50 µl FMS-liuosta. Näytelevy suojattiin silikonikannella ja vorteksoitiin (1600 rpm, 1 min, BioShake XP), jonka jälkeen näytteet sentrifugoitiin alas. Näytteitä inkuboitiin lämpöblokissa (SciGene Hybex microsample incubator) +37°C:ssa 60 minuutin ajan, jolloin DNA pilkkoon-tui. DNA pilkottiin, jotta se kyettiin myöhemmissä vaiheissa hybridisoimaan mikrosirulle.

Pilkkomisen jälkeen DNA saostettiin. Näytteisiin lisättiin 100 µl PM1-liuosta ja näytelevyä vorteksoitiin 1600 rpm 1 minuutin ajan. Näytteitä inkuboitiin lämpöblokissa +37°C:ssa 5 minuutin ajan, jonka jälkeen ne sentrifugoitiin (280 x g 1 min). Näytteisiin lisättiin 300 µl 2-propanolia ja näytelevy suojattiin uudella, puhtaalla silikonikannella. Näytelevyä käännettiin ylösalaisin 10 kertaa, jonka jälkeen se laitettiin inkuboitumaan +4°C:n 30 minuutin ajaksi. Inkubaation jälkeen näytteet kylmäseparoituin (+4°C, 2204 x g, 25 min, Eppendorf Centrifuge 5430R). Sentrifugoinnin jälkeen tarkistettiin, että näytteistä oli muodostunut sininen pelletti kaivojen pohjaan. Sinisen pelletin muodostuminen kertoi siitä, että näytteessä on DNA:ta ja jos pellettiä ei muodostu, tutkimusta ei kannata jatkaa. Näytteistä poistettiin supernatantti välittömästi sentrifugoinnin ja tarkistuksen jälkeen kaatamalla näytelevy puhdasta imupaperia vasten ja lyömällä näytelevyä 1 minuutin ajan aina uuteen, puhtaaseen kohtaan imupaperilla. Supernatantin poistamisen jälkeen näytelevyä kuivattiin ylösalaisin 60 minuutin ajan huoneenlämmössä.

Kuivatut näytepelletit uudelleensuspensoitiin 46 µl:aan RA1-liuosta. RA1:n lisäämisen jälkeen näytelevy suojattiin liimaamalla päälle folio, joka sinetöitiin lämpösinetöijällä (ThermoScientific ALPSTM 50V). Näytteitä inkuboitiin hybridisaatiouunissa (+48°C, 60 min), jonka jälkeen näytteet vorteksoitiin 1800 rpm 1 min ajan ja sentrifugoitiin alas. Vorteksointia ja sentrifugointia toistettiin, kunnes pelletit olivat liuenneet.

2.3.3 DNA:n hybridisaatio mikrosirulle

Näytteet denaturoitiin DNA:n hybridisaatiota varten. Näytteet denaturoitiin inkuboimalla niitä +95°C:lla lämpöblokillä 20 minuutin ajan, jolloin DNA muuttuu yksijuosteiseksi juosteiden välisten vetysidosten hajotessa. DNA denaturoitiin yksijuosteiseksi, jotta se kykenee hybridisoitumaan mikrosirulla olevien mikrohelmien oligoihin. Denaturaation jälkeen levyn annettiin jäähtyä huoneenlämmössä 30 minuutin ajan ja näytteet sentrifugoitiin alas. Näytteiden jäähtymisen aikana kasattiin hybridisaatiokammio, ja mikrosiru asetettiin pidikkeeseen valmistajan ohjeiden mukaisesti.

Näytteitä pipetoitiin ohjeesta (26 µl) poiketen 28 µl per näyte mikrosirulla oleviin näytekammioihin. Näytettä pipetoitiin 2 µl enemmän, jotta varmistuttiin siitä, ettei näytettä haihdu inkuboinnin aikana. Näytteiden annettiin imeytyä mikrosirun kammioon kokonaan, jonka jälkeen näytteitä lisättiin 5 µl haihtumisen estämiseksi. Mikrosiru asetettiin pidikkeessään hybridisaatiokammioon, joka suljettiin ja asetettiin +48°C hybridisaatiouuniin. Näytteitä inkuboitiin hybridisaatiouunissa 16 tunnin ajan, jonka aikana DNA hybridisoitui mikrosirulle. Inkubaation aikana valmisteltiin XC4-puskuri seuraavia työvaiheita varten lisäämällä siihen 330 ml 100 % etanolia (EtOH).

2.3.4 Mikrosirun pesu

16 tunnin inkubaation jälkeen hybridisaatiokammio poistettiin hybridisaatiouunista ja sen annettiin jäähtyä huoneenlämmössä 30 minuutin ajan, jonka jälkeen mikrosiru pestiin ylimääräisestä, hybridisoitumattomasta DNA:sta. Ylimääräinen DNA ja ylimääräiset reagenssit tuli pestä pois, jotta seuraavissa työvaiheissa tehtävä ekstensio ja värjäys onnistuu oikein eivätkä ne yhdisty nukleotideihin, jotka eivät ole hybridisoituneet mikrosirulle. Pesua varten valmisteltiin pesuastiat valmistajan ohjeiden mukaisesti, jotka täytettiin PB1-liuoksella. Mikrosiru poistettiin hybridisaatiokammioista, sirun muovikalvo poistettiin ja siru ja asetettiin pesutelineeseen, jota nosteltiin ensimmäisessä pesuastiassa 1 minuutin ajan. Ensimmäisen pesun jälkeen sirua nos-

teltiin toisessa pesuastiassa 1 minuutin ajan. Pesujen jälkeen kasattiin läpivirtauskammio valmistajan ohjeiden mukaisesti ja siru asetettiin kammioon. Sirua pidettiin kammiossa, kunnes vesikiertolämpöhaude oli valmisteltu valmistajan ohjeiden mukaisesti.

2.3.5 Ekstensio ja värjäys

Ekstensio ja värjäys työvaiheessa hybridisoituneeseen ja pestyyn DNA:han tehtiin yhden emäksen ekstensio, joka sisälsi dinitrofenolileiman (A ja T emäkset) tai biotiinileiman (C ja G emäkset). Nämä leimat värjättiin anti-DNP-punaisella (A ja T emäkset) tai streptavidin-vihreällä (C ja G emäkset) kuvantamista varten.

Läpivirtauskammiossa oleva siru asetettiin vesikiertolämpöhauteeseen (Illumina TeFlow) jonka lämpötila oli $+44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Läpivirtauskammioon pipetoitiin 150 μl RA1-liuosta ja inkuboitiin 30 sekunnin ajan. Pipetointi ja inkubointi toistettiin neljästi, jolloin yhteensä RA1-liuosta oli lisätty viisi kertaa kammioon. RA1:n jälkeen kammioon pipetoitiin 450 μl XC1-liuosta ja inkuboitiin 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen kammioon pipetoitiin 450 μl XC2-liuosta ja inkuboitiin 10 minuutin ajan. XC2:n lisäämisen ja inkuboinnin jälkeen lisättiin 200 μl TEM-liuosta ja kammiota inkuboitiin 15 minuutin ajan. Inkuboinnin aikana valmistettiin 95 % formamidi/1mM EDTA-liuos, jota pipetoitiin kammioon 450 μl ja kammiota inkuboitiin 5 minuutin ajan. Inkuboinnin jälkeen vesikiertolämpöhauteen lämpötila asetettiin STM-liuoksen putkessa olevan lämpötilan mukaiseksi. Lämpöhauteen jäähtyessä kammioon pipetoitiin 450 μl XC3-liuosta ja inkuboitiin 1 minuutin ajan, joka toistettiin kerran.

Lämpöhauteen ollessa oikeassa lämpötilassa läpivirtauskammioon pipetoitiin 250 μl STM-liuosta ja kammiota inkuboitiin 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen kammioon pipetoitiin 450 μl XC3-liuosta ja kammiota inkuboitiin 1 minuutin ajan, joka toistettiin kerran. Toiston jälkeen kammiota inkuboitiin 5 minuuttia, jonka jälkeen kammioon pipetoitiin 250 μl ATM-liuosta ja kammiota inkuboitiin 10 minuutin ajan. Tämän jälkeen kammioon pipetoitiin 450 μl XC3-liuosta ja inkuboitiin 1 minuutin ajan, joka toistettiin kerran. Toiston jälkeen kammiota inkuboitiin 5 minuuttia. Edellä mainitut STM-, XC3-, ATM- ja uudelleen XC3-lisäykset toistettiin

toisen kerran samoilla inkubaatioajoilla. Kammioon lisättiin tämän jälkeen vielä kerran STM- ja XC3-liuosten lisäys samoilla inkubaatioajoilla kuin aikaisemmin. Yhteensä kammioon lisättiin 3 kertaa STM-liuos ja 2 kertaa ATM-liuos aina vuorotellen XC3-liuoksen lisääminen välissä. Viimeisen inkuboinnin jälkeen läpivirtauskammio nostettiin vesikiertolämpöhauteesta ja asetettiin vaakatasossa PB1 liuokseen odottamaan seuraavia työvaiheita.

2.3.6 Mikrosirun pesu, päällystäminen ja kuvaus

Mikrosirun ekstension ja värjäyksen jälkeen sirulta pestiin ylimääräiset reagenssit, jotta ne eivät jääneet mikrosirulle aiheuttamaan häiriötä kuvaamiseen. Pesuastiat valmisteltiin valmistajan ohjeiden mukaisesti ja läpivirtauskammio purettiin. Mikrosiru asetettiin pesutelineelle, jota nosteltiin 10 kertaa PB1-liuoksessa, jonka jälkeen siru upotettiin PB1-liuokseen 5 minuutin ajaksi. Tämän jälkeen sirua nosteltiin 10 kertaa XC4-liuoksessa ja upotettiin siihen 5 minuutin ajaksi.

Siru nostettiin XC4-liuoksesta ja asetettiin kuivumaan putkitelineen päälle. Teline asetettiin vakuuiekksikaattoriin. Sirua kuivattiin vakuuiekksikaattorissa (VWR vacuum gas pump) 675 mm Hg (0.9 bar) 60 minuutin ajan. Kuivauksen jälkeen sirun taustapuolelta pyyhittiin etanoliin kostutetulla nukkaamattomalla paperilla pois ylimääräinen päällystysaine. Tämän jälkeen siru asetettiin pimeään odottamaan kuvausta. Mikrosiru kuvattiin Illuminan NextSeq550 Dx-laitteella valmistajan ohjeiden mukaisesti.

2.4 Datan käsittely

2.4.1 Laadunvarmistus

Laadunvarmistus tehtiin Illuminan GenomeStudio-ohjelmalla. Ohjelmalla tarkistettiin CpG-alueiden kattavuus, jonka tuli olla FFPE-näytteillä yli 90 %. GenomeStudiolla varmistettiin

myös sisäisten laadunvarmistuskontrollien avulla bisulfiittikonversion, värjäyksen, ekstension, hybridisaation ja kohteen poistamisen onnistuminen, sekä negatiivisten kontrollien onnistuminen. Nämä laadunvarmistuskontrollit sisältyivät Illuminan EPIC v2-kitin reagensseihin. Laadunvarmistuskontrollien avulla näytteistä nähtiin, miten eri työvaiheet olivat onnistuneet näytteistä riippumattomien kontrollien avulla ja miten käytössä olleiden näytteiden käsittelyt olivat onnistuneet näytteistä riippuvaisten kontrollien avulla. Näytteistä riippumattomia kontrolleja oli ekstension ja värjäyksen onnistumisen kontrollit, kohteen poistamisen kontrolli, jolla nähtiin miten hyvin ekstension jälkeen DNA-templaatin poistaminen onnistui sekä hybridisaatiokontrolli, jolla nähtiin miten hyvin DNA hybridisoitui mikrosirulle. Näytteistä riippuvaisia kontrolleja oli tarkkuuskontrolli, jolla havaittiin, onnistuiko näytteen hybridisoituminen mikrosirun oligoihin koko oligon matkalta vai osittaisesti, epäspesifisen sitoutumisen kontrollit, joiden avulla havaittiin, onko näyte puhdas muusta kuin ihmisperäisestä DNA:sta ja onko DNA tarpeeksi laadukasta sekä ei-polymorfiset kontrollit, joiden avulla kyettiin vertailemaan koko tutkimuksen onnistumista eri näytteiden välillä. Näiden lisäksi tutkittiin myös bisulfiittikonversion onnistuminen omalla kontrolleilla, joiden perusteella havaittiin, jos näytteissä oli konvertoitumatonta DNA:ta. Lukuisten kontrollien avulla tutkimuksen onnistuminen pystyttiin arvioimaan tarkasti.

2.4.2 Metylaatioanalyysit

DNA:n metylaatioluokitus selvitettiin Brain Classifier -luokittelualgoritmin (versio 12.8) avulla, jolla myös analysoitiin *MGMT*-geenin promoottorialueen metylaatiostatus (Capper ym., 2018a). Luokittelualgoritmilla saadaan myös kopiolukuanalyysi, mutta tarkemman analysoinnin ja kuvanlaadun vuoksi kopiolukuanalyysi tehtiin myös R-ohjelmistolla (R.4.4.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) käyttäen *conumee2*-pakettia (versio 2.1) (Daenekas ym., 2024). Kopiolukuanalyysissä kontrolleina käytettiin seitsemää tervettä keuhkokudosnäytettä Noguera-Castells ym. (2023) tekemästä tutkimuksesta (Gene Expression Omnibus -numero GEO222919), sillä tutkielman puitteissa ei ollut mahdollista saada normaalia aivokudosta kontrolliksi. Kontrollinäytteiksi valittiin kyseiset keuhkokudosnäytteet, sillä muita Illuminan EPIC v2-mikrosirulla analysoituja normaalikudosnäytteitä ei ollut saatavilla.

Valvomaton stokastinen klusterointi t-jakauman mukaan (t-SNE, t-distributed stochastic neighbor embedding) tehtiin Rtsne-paketilla (versio 0.17) näytteiden metylaation perusteella. Klusteroinnissa referenssinäytteinä käytettiin Capper ym., (2018a) tutkimuksen (GSE109381) meningeoomanäytteiden prosessoimattomia .idat-tiedostoja. Klusterointiin valittiin 500 keskihajonnan perusteella suurimman metylaation eroavaisuuden selittävää oligoa, eli oligot joissa metylaation keskihajonta oli suurinta. Keskihajonnan laskennasta jätettiin pois kaikki oligot, joissa ei ollut intensiteettiarvoa yhdessäkään näytteessä tuloksien vinouman välttämiseksi. T-SNE analyysin tulokset visualisoitiin ggplot2-paketilla (versio 3.5.1). Kaikki käytetyt R-komennot ovat liitteessä 1.

2.5 Prospektiivinen riskianalyysi

Prospektiivinen riskianalyysi tehtiin Lääketieteellisten laboratorioden pätevyysvaatimusten standardin ISO 15189:2022 (International Organization for Standardization) mukaisesti. ISO 15189:2022 5.6 Riskien hallinta -osion mukaisesti laboratorion johdon tehtävä on 1) luoda, implementoida ja ylläpitää prosesseja, joilla voidaan tunnistaa potilaisiin kohdistuvien haittojen riskit, 2) tunnistettava mahdollisuudet potilaiden saaman hoidon parantamiseen omissa kokeissaan ja aktiviteetissaan sekä 3) kehittää toimia niin riskienhallintaan, että mahdollisuuksien kehittämiseen. Tutkielman yhteydessä tehty prospektiivinen riskianalyysi kattaa ISO 15189:2022-standardin vaatimukset riskien tunnistamisesta Illumina Infinium Methylation EPIC v2-menetelmässä. Menetelmän riskit kuvattiin työvaiheittain DNA:n eristämisestä tulosten analysointiin asti.

Tunnistetut riskit luokiteltiin kolmeen eri luokkaan niiden todennäköisyyden sekä vakavuuden mukaisesti; pienen, keskisuuren ja suuren luokan riskeihin. Pienen luokan riskeissä todennäköisyys riskin tapahtumiselle on matala ja/tai mahdollinen vahinko on pieni. Keskisuuren tason riskeillä on kohtalainen todennäköisyys tapahtua ja/tai mahdollinen vahinko on kohtalainen. Suuren riskin luokassa todennäköisyys riskin tapahtumiselle on korkea ja/tai mahdollinen vahinko on mittava. Vahinkojen luokittelussa huomioitiin seuraamusten vakavuus. Esimerkiksi potilasnäytteiden sekaannuksella on mittavat seuraamukset, jolloin mahdollinen vahinko on suuri. Reagenssien sekoittaminen keskenään johtaa menetelmän epäonnistumiseen, jolloin työ

tulee aloittaa alusta, ja on vahinko, jolla on kohtalaiset seuraamukset: Potilaan diagnoosi viivästyy, mutta potilasnäytteitä ei ole sekoitettu, jolloin diagnoosi ei ole kuitenkaan väärä, kuten korkean seuraamuksen vahingoilla. Pienen seuraamuksen vahinko on esimerkiksi lievästi väärä inkubaatioaika, joka ei kuitenkaan johda menetelmän uusintaan vaan esimerkiksi saatujen tulosten laatuun hieman heikentävästi. Tällöin potilas saa oikean diagnoosin mahdollisesti hieman matalammilla luokittelijapisteillä, mutta tulos on yhä käyttökelpoinen. Riskin toteutumisen todennäköisyyden ja toteutuneen riskin vakavuuden perusteella määritettiin kokonaisriskiluku. Kokonaisriskiluku lasketaan kertomalla todennäköisyys vakavuudella (asteikoilla 1–3), jolloin matalain mahdollinen riskiluku on 1 ja korkein mahdollinen riskiluku on 9. Valtaosa riskeistä sijoittui asteikolle 1-4, eikä korkeimman mahdollisen riskiluvun tapahtumia todettu yhtään.

Prospektiiviseen riskianalyysiin kirjattiin myös esiteltyjä riskejä ennaltaehkäisevät toimenpiteet, kuten ISO 15189:2022 vaatii. Lisäksi analyysiin kirjattiin korjaavat toimenpiteet, jos riski on tapahtunut, jotta tapahtuman seuraukset voitaisiin minimoida ja tuoda asianomaisten tietoon välittömästi. Prospektiivinen riskianalyysi on liitteenä (Liite 4).

2.6 Tekoälyn käyttö tutkielmassa

Tämän tutkielman tekemiseen on käytetty tekoälyä apuna. Open AI:n kehittämää Chat GPT kielimallia (<https://chatgpt.com/>) käytettiin apuna kopiolumuanalyysin kontrollidatan käsittelyssä R-ohjelmiston avulla. Chat GPT -kielimallin ehdottamien ohjeiden avulla avattiin kopiolumuanalyysin kontrollidata, käsiteltiin kontrolleiksi valitut keuhkokudosnäytteet (Lu_H_01..Intensity.Signal – Lu_H_07..Intensity.Signal) kaikesta datasta ja tallennettiin uusi, muokattu data kopiolumuanalyysiä varten.

Chat GPT:tä käytettiin myös t-SNE analyysien R-koodien kirjoittamisen tukena. Kielimallin antamien ehdotusten avulla muokattiin .idat-tiedostot oikeaan taulukkomuotoon, poistettiin NA-arvot taulukosta ja poistettiin referenssinäytteistä GSM-etuliitteet. Chat GPT kielimallia käytettiin apuna myös t-SNE kuvaajien teossa ja ggplot-komentojen suunnittelussa.

Chat GPT-kielimallin lisäksi tutkielmassa käytettiin muita tekoälymenetelmiä. Tutkielmassa hyödynnettiin myös eri koneoppimismenetelmiä, sillä tulosten analysointiin käytetty Brain Classifier -luokittelualgoritmi on koneoppimiseen pohjautuva algoritmi. Myös t-SNE analyysi on koneoppimiseen perustuva menetelmä.

3 Tulokset

Tässä Pro gradu tutkielmassa analysoitiin 17 atyyppisen meningeoomanäytteen metylaatioprofiilit ja kopiolumuutokset. Kaikki tapaukset luokiteltiin Sahm ym. (2017) artikkelin mukaisesti metylaatioluokkiin; matalan uusiutumisen kasvaimet luokiteltiin Ben-1, Ben-2 tai Ben-3 (benign 1–3) luokkiin, kohtalaisen uusiutumisen kasvaimet Int-A tai Int-B (Intermediate A/B) -luokkiin ja kliiniseltä kovaltaan aggressiiviset Mal-luokkaan (Malignant). Metylaatiostatuksen selvittämiseen käytettiin Heidelbergin yliopistollisen sairaalan (UKHD), Hopp:n lasten syöpäkeskuksen Heidelberg (KITZ) ja Saksan syöpätutkimuskeskuksen (DKFZ) kehittämää ja ylläpitämää Brain Classifier -luokittelualgoritmia. (Capper ym., 2018a).

3.1 Brain Classifier -luokittelualgoritmin tulosten tulkinta

Luokittelualgoritmin perustana toimii satunnainen metsäalgoritmi (random forest algorithm), joka on koneoppimisessa käytetty algoritmi (Breiman, 2001). Satunnaisessa metsäalgoritmista yhdistetään monta päätöksentekopuuta, jotka saavat osan alkuperäisestä datasta käyttöönsä. Nämä päätöksentekopuut luovat eri ratkaisut ja yhdistettäessä äänestävät kaikista todennäköisintä ratkaisua (Breiman, 2001). Satunnaisella metsäalgoritmilla Capper ym. (2018a) rakensivat 10 000 binääristä päätöspuuta, joiden avulla he saivat sijoitettua diagnostiset tapaukset 91:n eri luokkaan johtaen yhteenlaskettuun raaka-arvoon (raw score). Jotta raaka-arvoista saadaan todennäköisyysarvoja diagnostiikkaan, Capper ym. (2018a) käyttivät multinomiaalista logistista regressio -kalibroitimallia, jonka avulla saadaan kalibroitu arvo (calibrated score). Luokittelualgoritmi ennustaa metylaatioluokan kalibroidun arvon perusteella, joka on todennäköisyysarvo oikealle tunnistamiselle (Capper ym., 2018b). Luokittelijan raja-arvo luotettavalle tunnistamiselle on 0.9 kalibroitu arvo. Luokittelija antaa tuloksen myös näytteille, joiden kalibroitu arvo ei yllä 0.9 rajalle asti, mutta nämä tulokset eivät ole Capper ym. (2018b) mukaan yksistään luotettavia.

Jaunmuktane ym. (2019) totesivat tutkimuksessaan, että luokittelualgoritmin tulokset, joiden kalibroitu arvo on alle 0.84 ovat silti tulkittavissa luokittelijan antamien kopiolumuutosten

perusteella. Luokittelijan antamat kopiolumuutokset eivät ole riippuvaisia tai yhteydessä metylaatioluokituksen tuloksiin, jolloin molempia voidaan käyttää diagnostiikan tukena toisistaan riippumatta (Capper, ym., 2018b). Sahm ym. (2024) suosittelevat uusimmassa cIMPACT-NOW (The Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy-Not Official WHO) välikatsauksessaan käyttämään metylaatioluokituksen ja kopiolumuutosten tuloksia yhdessä ainoastaan silloin, kun ne viittaavat samaan tulokseen. Brain Classifier -luokittelualgoritmin antamat tulokset ja kopiolumuutosten tulokset ovat listattuna taulukossa 1.

Taulukko 1. Näytteiden metylaatioluokka ja kopiolumuutokset

Metylaatioluokka on Brain Classifier -algoritmin ehdottama ja se on tarkennettu conumee 2.0 kopiolumuutosten tuloksien perusteella. Kalibroidut arvot ovat luokittelualgoritmin antamat todennäköisyydet metylaatioluokille. Kopiolumuutokset on listattu kromosomeittain ja osittaiset kromosomimuutokset on merkattu käsivarren tarkkuudella (p/q)

Näyte #	Metylaatioluokka	Kalibroitu arvo	Kopiolumuutokset
1	Int-A	Meningeooma 0.97, Ben-1 0.59, Int-A 0.31	Alimäärä 1p, 5p, 6q, 14q, 22q. Ylimäärä 17
2	Int-A/B	Meningeooma 0.99, Int-A 0.51, Int-B 0.48	Alimäärä 1p, 5q, 10q, 11p, 14q, 16, 18, 22q
3	Ben-1	Meningeooma 0.99, Ben-1 0.92	Alimäärä 22q
4	Ben-2	Meningeooma 0.97, Ben-2 0.78	-
5	Int-A	Meningeooma 0.99, Int-A 0.99	Alimäärä 1p, 6, 14q, 18q, 22q
6	Int-A	Meningeooma 0.96, Int-A 0.80	Alimäärä 1p, 16, 17q, 22q. Ylimäärä 17
7	Ben-2	Meningeooma 0.87, Ben-2 0.58	-
8	Ben-1	Meningeooma 0.90, Ben-3 0.37, Int-A 0.35	Alimäärä 14q, 22q
9	Ben-2	Meningeooma 0.99, Ben-2 0.87	Alimäärä 2q
10	Ben-1	Meningeooma 0.7, Ben-1 0.63	Alimäärä 22q
11	Ben-1	Meningeooma 0.67, Ben-1 0.62	Alimäärä 19, 22q
12	Int-A	Meningeooma 0.99, Int-A 0.52, Ben-3 0.38	Alimäärä 1p, 3p, 7p, 14q, 18, 22q
13	Int-A	Meningeooma 0.98, Int-A 0.47, Ben-1 0.48	Alimäärä 1p, 14q, 16q, 18, 22q
14	Int-A	Meningeooma 0.99, Int-A 0.99	Alimäärä 1p, 3, 4, 6q, 7p, 8p, 10, 11, 14q, 16q, 18, 22q. Ylimäärä 6q
15	Int-B	Meningeooma 0.99, Int-B 0.99	Alimäärä 1p, 2p, 3p, 4, 6q, 7p, 10q, 18, 22q. Ylimäärä 1q, 2q, 6p, 15q, 20
16	Ben-1	Meningeooma 0.99, Ben-1 0.99	Alimäärä 22q.

Näyte #	Metylaatioluokka	Kalibroitu arvo	Kopiolukumuutokset
17	Int-A	Meningeooma 0.99, Ben-2 0.50, Int-A 0.30	Alimäärä 1p, 6q, 10, 13, 14, 18, 22q

3.2 Matalan uusiutumISRISKIN metylaatioluokat ovat kopiolukumuutoksiltaan vähäisiä

Matalan uusiutumISRISKIN metylaatioluokkien meningeoomia oli 47 % näytteistä. Näille metylaatioluokille oli ominaista vähäiset kopiolukumuutokset (kuva 3B). Muodostetuista kopiolukumuutoskuvaajista on esimerkki kuvassa 3A ja kaikkien benignäytteiden kuvaajat ovat liitteessä 2.

Aikaisempien tutkimusten mukaisesti Ben-1 metylaatioluokkaan yhdistettiin tapaukset, joissa ilmeni kopiolukuanalyysissä alimäärää kromosomissa 22q (Maas ym., 2021). Luokittelualgoritmi tunnisti nämä tapaukset luotettavasti kahta näytettä (#10 & #11) lukuun ottamatta. Näillä näytteillä algoritmi ennusti luokan oikein 0.63 ja 0.62 todennäköisyydellä. Molemmissa näytteissä havaittiin kopiolukuanalyysissä alimäärää kromosomissa 22q, mikä tukee luokittelualgoritmin tuloksia.

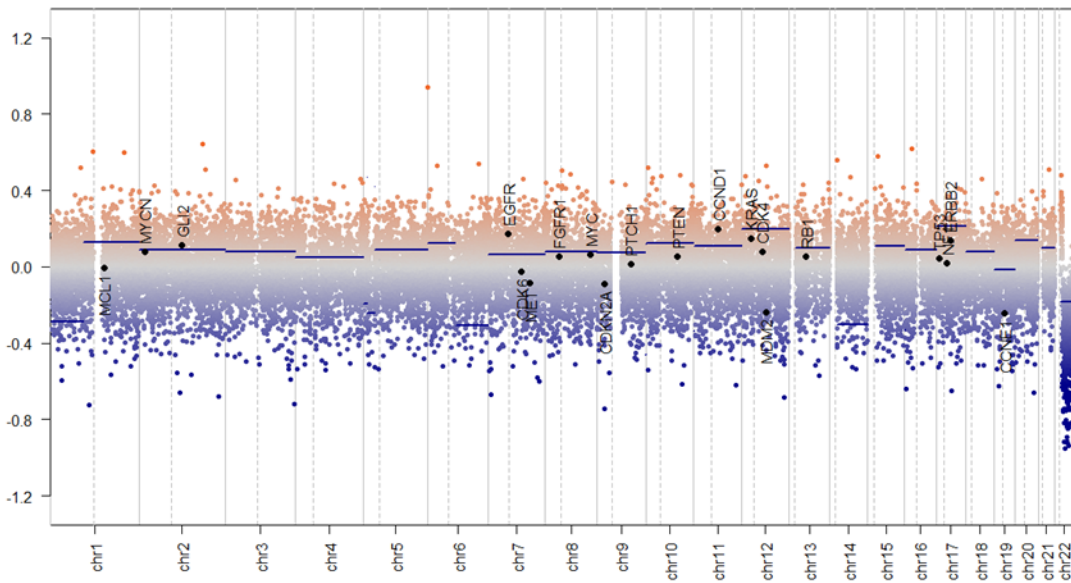
Ben-2 metylaatioluokkaan kuuluvia tapauksia yhdistää se, ettei niissä ilmene juurikaan kopiolukumuutoksia (Maas ym., 2021). Luokittelualgoritmin perusteella kaksi näytettä (#7 & #9) kuului Ben-2 metylaatioluokkaan 0.58 ja 0.87 todennäköisyyksillä. Algoritmin ehdottamia metylaatioluokkia tukee kopiolukuanalyysi, jolla todettiin näytteessä #9 olevan havaittavissa pieni alimäärä 2q kromosomissa ja näytteestä #7 ei havaittu lainkaan kopiolukumuutoksia, mikä on ominaista Ben-2 metylaatioluokalle.

Luokittelualgoritmin avulla ei saavutettu osumaa näytteelle #8. Algoritmi ennusti näytteen mahdollisesti kuuluvan Ben-3 luokkaan 0.37 todennäköisyydellä ja Int-A luokkaan 0.34 todennäköisyydellä. Kopiolukuanalyysissä havaitaan näytteessä alimäärää kromosomeissa 14 ja 22q,

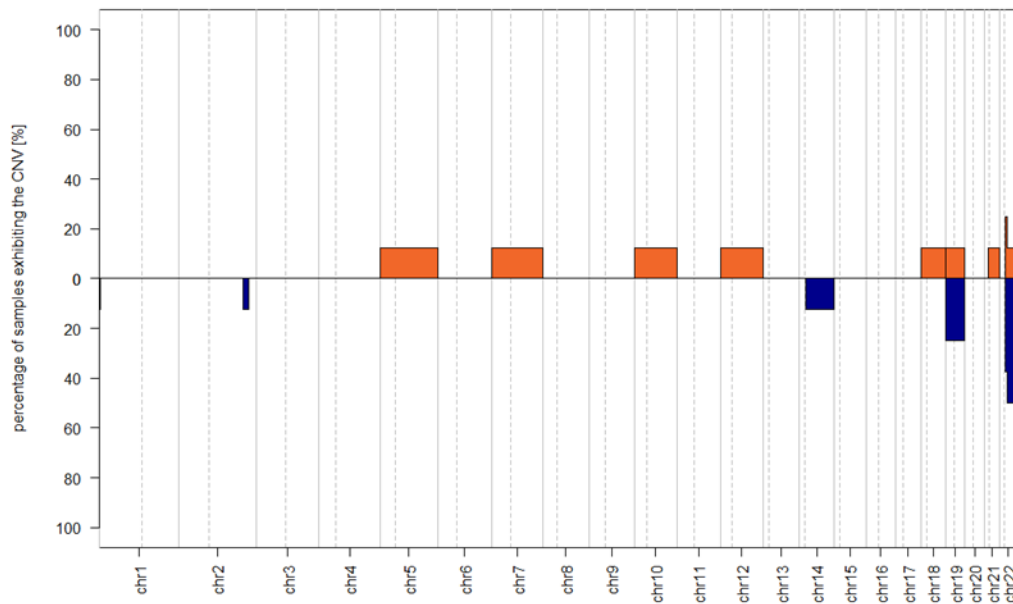
joista kromosomi 22q alimäärä viittaa hyvälaatuiseen, Ben-1 luokan meningeomaan. Kromosomin 14 alimäärä on aiemmissa tutkimuksissa linkitetty sekä huonompaan ennusteeseen, jolloin mahdollinen metylaatioluokka olisi Int-A, sekä myös parempaan ennusteeseen, jolloin mahdollinen metylaatioluokka olisi ennemmin Ben-3 (Marastoni & Baresi 2024). Muiden kopiolumuutosten puutteen vuoksi todennäköisempi ennuste kyseiselle näytteelle olisi Ben-1 luokka, sillä Int-A metylaatioluokkaan on yhdistetty muita kopiolumuutoksia, yleisempänä alimäärä kromosomissa 1p (Maas ym., 2021; Marastoni & Baresi 2024). Sahn ym. (2024) välikatsausartikkelin mukaan näytteen #8 tuloksia ei kuitenkaan voida käyttää luotettavasti potilaan diagnoosin tarkentamisessa, sillä kopiolumuutokset eivät ole täysin yhteneviä luokittelualgoritmin antamien metylaatioluokkien kanssa ja luokittelualgoritmin ehdottamien metylaatioluokkien todennäköisyydet ovat liian matalia luotettavaan luokitteluun.

Kaikissa benign-metylaatioluokan näytteissä yhteneväistä on se, ettei niissä havaittu juurikaan kopiolumuutoksia, lukuun ottamatta 22q alimäärää, joka ilmeni noin 50 % benign-luokan tapauksista (kuva 3B). Myös kromosomissa 18 havaittiin jonkin verran alimäärää, noin 30 %:ssa näytteitä. Pienen näytemäärän vuoksi muiden kopiolumuutosten yleisyyteen ei voida ottaa kantaa, mutta kirjallisuudessa on aiemmin todettu benign-metylaatioluokissa esiintyvän myös muita muutoksia, kuten eri kromosomien ylimääriä (Sahn ym., 2017).

A



B



Kuva 3 Ben-metylaatioluokkien kopiolumuutokset. Esimerkkikuva kopiolumuutoksista. Kromosomit 1–22 on kuvattu x-akselilla ja kromosomien p- ja q-käsivarret ovat eroteltuna harmaalla katkoviivalla. Kromosomien ylimäärä on kuvattu oranssilla ja alijäämä sinisellä värillä ja näiden keskiarvo on kuvattu yhtenäisenä tummansinisenä viivana. Yksittäinen piste kuvaa yhtä tutkittua CpG-kohdetta (A). Yhteenveto kaikista Bening-metylaatioluokan kopiolumuutoksista. Kromosomit 1–22 on kuvattu x-akselilla ja kromosomien p- ja q-käsivarret ovat eroteltuna harmaalla katkoviivalla ja y-akselilla on kuvattu kopiolumuutosten prosentiosuus kaikissa bening-metylaatioluokan näytteissä (B).

3.3 Kohtalaisen uusiutumisen metylaatioluokkia yhdistää laajemmat kopiokummut

Kohtalaisen uusiutumisen metylaatioluokkien meningeoomia oli 53 % näytteistä. Näille metylaatioluokille oli ominaista benign-metylaatioluokkaa merkittävästi laajemmat kopiokummut, kuin benign-metylaatioluokille (kuva 4B). Muodostetuista intermediate-metylaatioluokkien kopiokummutkuvaajista on esimerkki kuvassa 4A ja kaikkien intermediate-näytteiden kuvaajat ovat liitteessä 3.

Luokittelualgoritmi tunnisti Int-A luokkaan osan näytteistä suoraan 0.8–0.99 todennäköisyyksillä. Näille näytteille oli ominaista kromosomin 22q alimäärän lisäksi kromosomin 1p alimäärä sekä lukuisten muiden kromosomien alimäärät. Luokittelualgoritmi ei kyennyt tarkasti sijoittamaan kahta näytettä (#1 & #12) Int-A luokkaan, sillä niiden todennäköisyydet kuulua Int-A luokkaan olivat 0.31 ja 0.52. Näytteiden kopiokummut tukevat luokittelualgoritmin tuloksia, sillä molemmissa näytteissä oli havaittavissa selkeä alimäärä kromosomeissa 1p, 14q ja 22q, sekä myös muissa kromosomeissa. Aiemmissä tutkimuksissa etenkin 1p ja 22q alimäärät on myös linkitetty Int-A metylaatioluokkaan, kuten myös muiden kromosomien osittaiset alimäärät (Sahm ym., 2017; Maas ym., 2021).

Yhtä 0.99 todennäköisyydellä intermediate-luokkaan tunnistettua näytettä (#2) ei kyetty metylaatiostatuksen tai kopiokummutosten perusteella tunnistamaan tarkemmin Int-A tai Int-B luokkaan. Luokittelualgoritmin perusteella näyte kuului 0.51 todennäköisyydellä Int-A metylaatioluokkaan ja 0.48 todennäköisyydellä Int-B luokkaan. Sahm ym. (2017) tutkimuksessa Int-A ja -B luokat eroavat toisistaan homotsygoottisella *CDKN2A/B*-geenin (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B) deleetiolla, joka on ominainen Int-B metylaatioluokalle. Kyseistä deleetiota ei ole näytteestä #2 havaittavissa. Tällä menetelmällä ei pystytä selvittämään *TERT*-geenin promoottorialueen mutaatioita, jotka myös ovat ominaisia Int-B metylaatioluokalle, joten tarkempi tunnistus näytteen metylaatioluokalle ei onnistunut. Näyte täten luokiteltiin kuuluvan

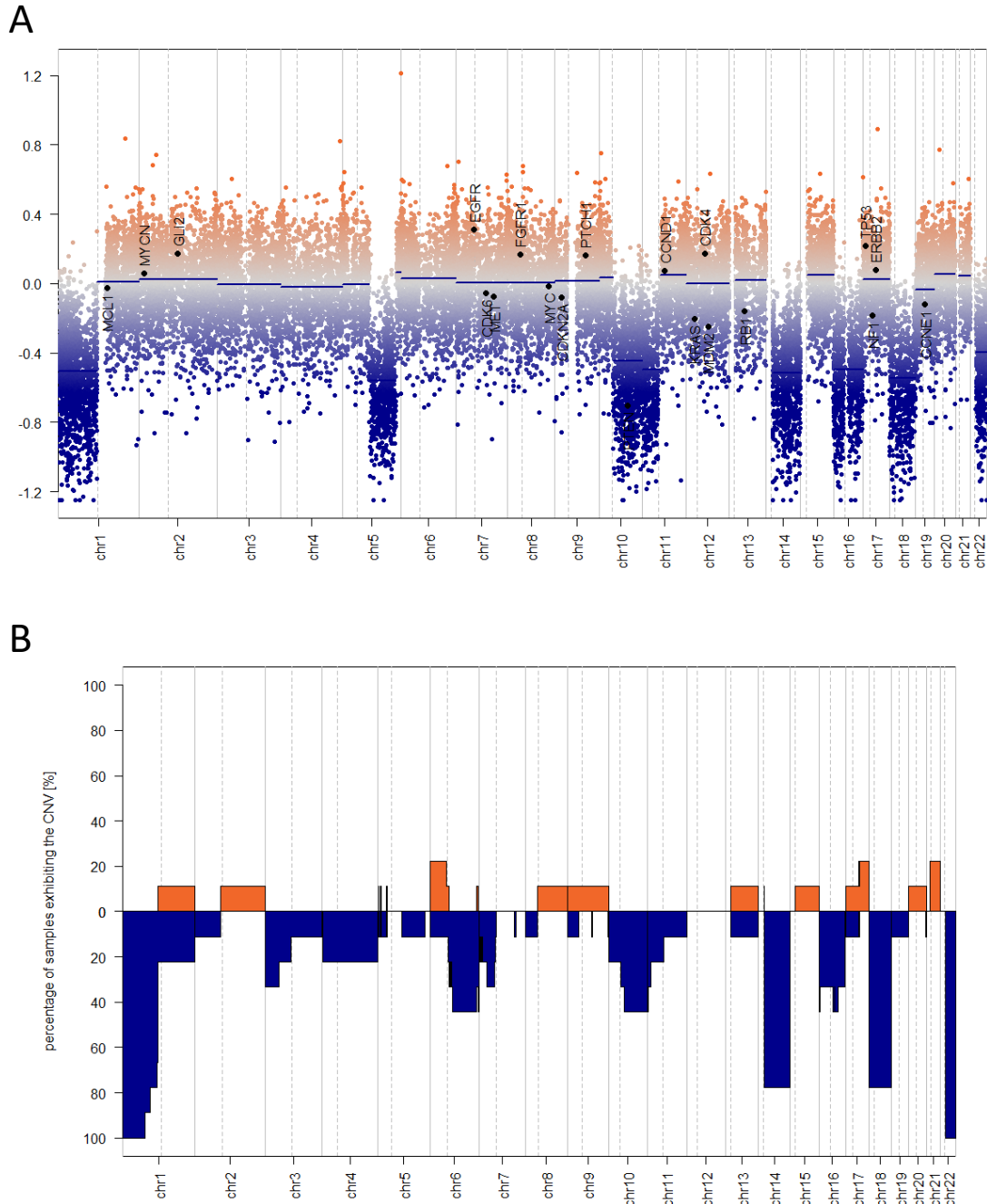
Int-A/B metylaatioluokkiin, sillä luokittelualgoritmin ehdottamien metylaatioluokkien todennäköisyydet ovat liian matalia luotettavaan erotteluun. Meningeooman tarkempi tunnistaminen voitaisiin tehdä esimerkiksi NGS-menetelmällä, jolla havaittaisiin kopiolumuutokset tarkasti *CDKN2A/B* alueelta sekä *TERT*-geenin promoottorialueen mutaatiot.

Int-A metylaatioluokan näytteessä #14 todettiin fokaalinen *CDKN2A*-geenin deleetio, joka on korostettuna kopiolumukuvaajassa (liite 3). *CDKN2A*-geenin deleetio yhdessä kromosomi 10 alimäärän kanssa viittaisi siihen, että kyseessä on pahanlaatuisesti käyttäytyvä meningeooma, jolloin näytteen metylaatioluokka nousisi Int-A luokasta Mal metylaatioluokkaan (Sahm ym., 2017). Brain Classifier -luokittelualgoritmi ei toistaiseksi tunnista EPIC v2-mikrosirulla tehdyistä näytteistä fokaalisia deleetioita yhtä tarkasti, sillä pro gradu -tutkielman aineiston käsittelyn aikana luokittelijassa käytettiin conumee-paketin vanhempaa 1.0 versiota. Tässä tutkimuksessa käytetty conumee 2.0-paketti on tarkempi nimenomaan fokaalien deleetioiden tunnistamisessa (Daenekas ym., 2024), jolloin näytteessä ilmenevä *CDKN2A*-deleetio on todennäköisesti todellinen. Koska luokittelualgoritmi ei kuitenkaan tunnista *CDKN2A*-deleetiota ja pitää Int-A metylaatioluokkaa todennäköisempänä, tuloksien käyttö potilaan diagnoosin nostamisessa Int-A luokasta Mal luokkaan ei ole kuitenkaan tarpeeksi perusteltua. Jatkotutkimuksien, kuten esimerkiksi FISH-tutkimuksen (fluorescent *in situ* hybridisation) myötä voitaisiin varmistua *CDKN2A*-geenin deleetiosta, jolloin potilaan diagnoosi tarkentuisi.

Luokittelualgoritmi ei kyennyt luokittelemaan näytettä #17 tarkasti mihinkään metylaatioluokkaan, 0.50 todennäköisyydellä se kuului Ben-2 luokkaan ja 0.30 todennäköisyydellä Int-A luokkaan. Kopiolumuutoksia näytteestä oli havaittavissa useita, alimäärää oli kromosomeissa 1, 6q, 10, 13, 14 18 ja 22q. Runsaiden alimääräisten kopiolumuutosten vuoksi näyte ei todennäköisesti kuulu algoritmin suosittamaan Ben-2 luokkaan, sillä sen tulisi olla kopiolumuutoksiltaan neutraali (Sahm ym., 2017; Maas ym., 2021). Näytteen tuloksia ei kuitenkaan voida käyttää luotettavasti potilaan diagnoosin tarkentamisessa, sillä kopiolumuutokset eivät ole täysin yhteneviä luokittelualgoritmin antamien metylaatioluokkien kanssa (Sahm ym., 2024).

Kaikissa kohtalaisen uusiutumISRISKIN meningeoomissa on havaittavissa runsaasti kopiolumuutoksia ja aiemman kirjallisuuden (Maas ym., 2021) mukaan tutkimuksessa todettiin 22q ja

1p alimäärien olevan tyypillisiä muutoksia, sillä ne esiintyvät kaikissa näytteissä (kuva 4B). Muista muutoksista yleisiä ovat myös kromosomien 14q ja 18 kromosomien alimäärät, joita esiintyi 80 %:ssa tapauksia.

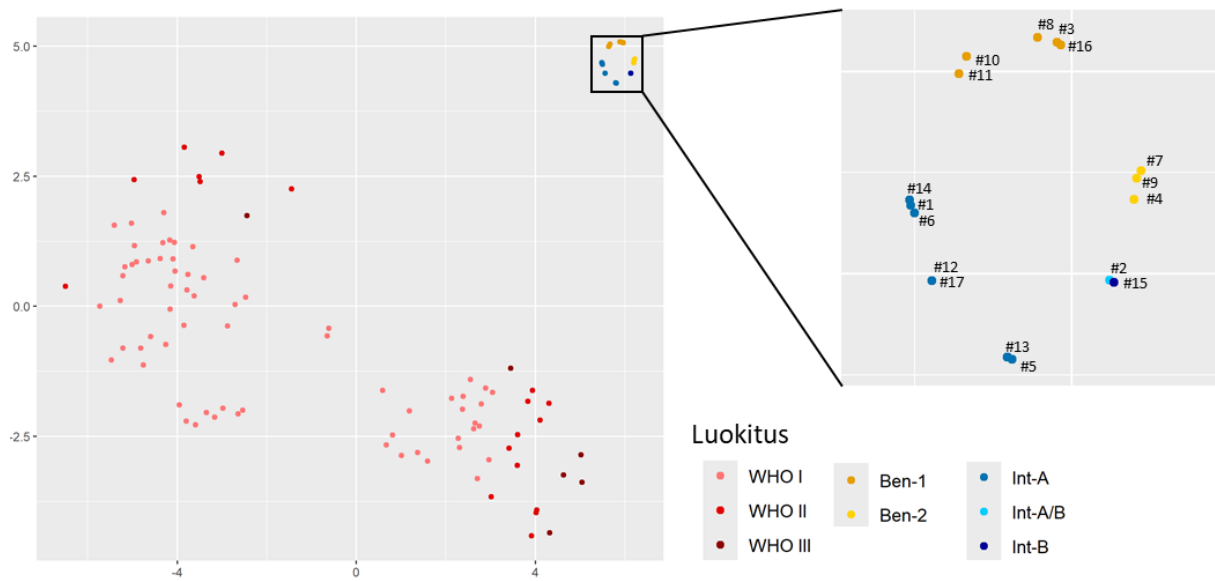


Kuva 4 Int-metylaatioluokkien kopiolumuutokset. Esimerkkikuva kopiolumuutoksista. Kromosomit 1–22 on kuvattu x-akselilla ja kromosomien p- ja q-käsivarret ovat eroteltuna harmaalla katkoviivalla. Kromosomien ylimäärä on kuvattu oranssilla ja alijäämä sinisellä värillä ja näiden keskiarvo on kuvattu yhtenäisenä tummansinisellä viivana. Yksittäinen piste kuvaa yhtä tutkittua CpG-kohdetta (A). Yhteenveto kaikista Intermediate-metylaatioluokan kopiolumuutoksista. Kromosomit 1–22 on kuvattu x-akselilla ja kromosomien p- ja q-käsivarret ovat eroteltuna harmaalla katkoviivalla ja y-akselilla on kuvattu kopiolumuutosten prosenttiosuus kaikissa intermediate-metylaatioluokan näytteissä (B).

3.4 Metylaatioluokat klusteroituvat erilleen toisistaan

Metylaatioluokkien klusterointia varten valittiin keskihajonnan perusteella 500 merkityksellistä oligoa t-SNE (t-distributed Stochastic Neighbor Embedding) -analyysiin. Klusteroinnin perusteella referenssinäytteet jakautuivat kahtia ja toisessa klusterissa on enemmän WHO 2 ja 3 graduksien meningeoomia kuin toisessa (kuva 5). Todennäköisesti joukko, jossa on enemmän WHO 2 ja 3 graduksien meningeoomia kuvaa Int-A/B ja Mal metylaatioluokkia, kun taas joukko, jossa on enemmän WHO 1 graduksen meningeoomia kuvaa Ben-metylaatioluokkia.

Tutkielman näytteet eroavat referensseistä omaan klusteriinsa, jonka sisällä eri metylaatioluokat erkanevat toisistaan. T-SNE-analyysissä klustereiden väliset etäisyydet eivät ole yhtä merkittäviä kuin yksittäisen klusterin sisäiset etäisyydet, joten näytteiden klusteroituminen kauas referenssinäytteistä ei ole tuloksien tulkinnan kannalta niin merkittävää (Pratt ym., 2021). Molemmat Ben-luokat muodostavat omat klusterinsa ja Int-metylaatioluokat muodostavat useampia alaklustereita. Int-A/B ja Int-B metylaatioluokat klusteroituvat keskenään, jolloin epävarma Int-A/B metylaatioluokan näyte #2 kuuluu todennäköisemmin Int-B luokkaan. Int-A metylaatioluokan näytteet jakautuvat useampaan alaklusteriin, joissa näytteet #12 ja #17 sekä #5 ja #13 ovat muista erillään. Vaikka Pratt ym. (2021) mukaan klustereiden sisäiset etäisyydet ovat merkisempiä kuin klustereiden etäisyydet, on kaikki Int-A näytteet kuitenkin melko lähellä toisiaan ja t-SNE:n voidaan todeta pystyvän erottelemaan eri metylaatioluokat toisistaan.



Kuva 5 Valvomaton klusterointi t-SNE analyysillä. Referenssinäytteet jakautuvat kahteen klusteriin ja tutkielman näytteet jakautuvat referensseistä erilleen. Tutkielman näytteet jakautuvat metylaatioluekan perusteella omiin klustereihin.

4 Johtopäätökset

Tässä tutkielmassa selvitettiin tarkennettu metylaatioluokka 17:lle atyyppiselle meningeoomalle Brain Classifier -luokittelualgoritmin ja kopiolumenalyysin avulla. Atyyppisten meningeoomien uusiutumiskasvun riski on hankalaa arvioida pelkästään histologisesti, sillä histologisen kuvan perusteella ei pystytä tarkasti päätellä kasvaimen käyttäytymistä ja uusiutumiskasvun riskiä. Tutkielmassa havainnollistettiin myös t-SNE klusteroinnin potentiaalia etenkin epäselvien atyyppisten meningeoomien metylaatioluokan tunnistamisessa pohjaten näytteen metylaatioprofiiliin.

4.1 Menetelmän validointi

Pro gradu -työssä tehty tutkimus on osa metylaatioprofilointimenetelmän validaatiota ja validoinnin myötä tutkielmassa käytetyt menetelmät on todettu toimivaksi ja toistettaviksi Tyks genomikan laboratoriossa. Tutkimusmenetelmä on validoitava laboratoriossa, sillä Illuminan EPIC v2- mikrosirumenetelmä ei ole CE-IVD menetelmä mikä tarkoittaa, ettei Illumina ole validoinut menetelmää sellaisenaan *in vitro* diagnostiikassa käytettäväksi. Myöskään Brain Classifier -luokittelualgoritmia ei ole validoitu diagnostiseen käyttöön, jolloin sekin on validoitava. Pro gradu -tutkielmassa ja Tyks genomikan laboratorion tekemässä validoinnissa menetelmien todettiin soveltuvan ominaisuuksiltaan ja tarkkuudeltaan käytettäväksi diagnostiikassa.

Osana tutkielmaa tehdyn prospektiivisen riskianalyysin myötä selvitettiin menetelmän todennäköisimmät riskipaikat, jotka saattavat vaarantaa potilastulokset. ISO 15189:2022 standardin mukaisesti tehdystä prospektiivisessä riskianalyysissä todennäköisimmiksi riskeiksi ilmeni näytteiden sekaantuminen pipetoidessa niitä eri levyiltä toiselle levyille, lämpölevyltä näytteiden poistaminen ja siinä tapahtuva henkilövahinko sekä Brain Classifier -luokittelijan toimimattomuus. Kaikissa edellä mainituissa tapahtumissa kokonaisriskiluku oli 6 asteikolla 1–9. Koska riskianalyysi on tehty prospektiivisesti, kyseiset riskit on tunnistettu ennen niiden tapahtumista (Liite 4).

4.2 Metylaatioluokituksen epätarkkuus voi johtua monesta syystä

Tutkielmassa havaittiin, että kaikille näytteille ei kyetty määrittämään metylaatioluokkaa Capper ym. (2018a) ehdottamalla 0.9 kalibroidun arvon tarkkuudella. Mahdollisia syitä matalamman tarkkuuden tuloksille on useita. Epätarkat tulokset voivat johtua muun muassa DNA:n laadusta, sillä formaliinifiksointi aiheuttaa DNA:han vaurioita, jotka voivat vaikuttaa tuloksiin (Gnanapragasam, 2010). Osa näistä vaurioista voidaan korjata DNA:n eristyksessä, jossa entsymaattisesti korjataan DNA:n vaurioita. Samoja vaurioita syntyy myös bisulfiittikonversion aikana, jonka vuoksi osa tutkielman näytteistä ei onnistunut. Tutkielmassa havaittiin, että bisulfiittikonversion aiheuttamia vaurioita voidaan korjata restoraatiokitin avulla, jonka avulla epäonnistuneista näytteistä saatiin tuloksia.

Brain Classifier -luokittelualgoritmin tämänhetkinen heikkous on siinä, ettei se kykene tunnistamaan kaikille meningeoomille tarkkaa metylaatioluokkaa. Luokittelualgoritmi on edelleen kehityksessä meningeoomien metylaatioluokkien ja alaluokkien suhteen, jolloin tulokset eivät sellaisenaan ole täysin luotettavia. Esimerkiksi näytteelle #2 luokittelualgoritmi ei kyennyt tarkentamaan alaluokkaa, vaikka luokittelija tunnisti näytteen kuuluvan intermediate metylaatioluokkaan. Toinen hyvä esimerkki luokittelijan heikkoudesta on näyte #17, jolle algoritmi ehdottaa todennäköisemmäksi benign metylaatioluokkia kuin intermediate. Näytteessä olevat mitattavat kopiolumuutokset kuitenkin viittaavat suuremman uusiutumisen riskin meningoomaan, jolloin metylaatioluokka olisi vähintään intermediate. Nämä luokittelualgoritmin heikkoudet voivat johtua algoritmin koulutusdatasta. Jos koulutusdatassa ei ole tutkittavan näytteen kaltaisia referenssinäytteitä, algoritmilla on hankalampi antaa tarkkaa tulosta. Brain Classifier -luokittelualgoritmin kliinistä käyttöä varten onkin tärkeää, että neuropatologit perehtyvät metylaatioluokitukseen liittyvään molekyylibiologiaan ja etenkin kopiolumuutoksiin ja niiden tulosten tulkintaan, sillä kopiolumuutosten perusteella voi luotettavammin arvioida metylaatioluokkaa ja meningeooman uusiutumisen riskiä.

Toinen mahdollinen syy luokittelualgoritmin epävarmojen tulosten syyksi voi olla se, että näytteissä on matala tuumorisoluprosentti, eli kasvainsolujen lukumäärä suhteessa normaalikudok-

seen, jolloin suuri normaalikudoksen määrä näytteessä vaikeuttaa metylaatioluokan määrittämistä ja kopiolukumuutosten havaitsemista. Suuri määrä normaalikudosta ”laimentaa” näytettä, jolloin normaalien solujen tasainen kopiolukumäärä peittää alleen etenkin pienet tai heterotsygoottiset muutokset kasvainsoluissa. Matala tuumorisoluprosentti vaikeuttaa myös metylaatioluokan määrittämistä siten, että suuret muutokset metylaatiossa laimenevat pienemmiksi ja pienet muutokset saattavat hävitä näkyvistä, jolloin luokittelijan ennustama metylaatioluokka on todennäköisemmin uusiutumistodennäköisyydeltään matalampi kuin todellisuudessa

4.3 Metylaatiotutkimuksen kliininen merkitys meningeoomassa

WHO:n graduksen 2 meningeoomat ovat heterogeenisiä uusiutumisriskin suhteen. Joillain potilailla kasvain ei uusiudu lainkaan, kun taas joillain potilailla meningeooma uusiutuu pian hoidon jälkeen ja entistä pahanlaatuisempaan (Millesi ym., 2022). Metylaatiotutkimuksella on suuri potentiaali etenkin WHO:n graduksen 2 meningeoomien diagnosoinnin kehittämisessä. Metylaatiostatuksen ja tarkan metylaatioluokan määrittäminen mahdollistaa entistä tarkemman diagnostiikan, jolloin meningeooman uusintariski ja adjuvanttihoidon, kuten sädehoidon tarve, voidaan ennustaa tarkemmin (Sahm ym., 2021). Meningeoomissa metylaatioluokan selvittämisen lisäksi kopiolukumuutosten selvittäminen on tärkeää. Maas ym. (2021) totesivat tutkimuksessaan metylaatioluokkien toimivan parhaiten meningeooman kehityksen ennustamisessa, kun taas kopiolukumuutokset ja histologia kertovat enemmän kasvaimen tämänhetkisestä tilasta.

Meningeoomissa kasvaimen seurantatutkimukset tehdään magneettikuvauksella. Euroopan neuro-onkologian järjestö EANO (European Association of Neuro-Oncology) suosittelee WHO:n graduksen 2 meningeoomissa seurantaväliksi kuutta kuukautta ja viiden vuoden seurannan jälkeen 12 kuukautta. WHO graduksen 1 meningeoomissa seurantaväli on aluksi 12 kuukauden välein ja viiden vuoden seurannan jälkeen 2 vuoden välein (Goldbrunner ym., 2021). Jos WHO graduksen 2 meningeooman metylaatiostatuksen määrittämisellä saadaan selville, että kyseessä on Ben 1–3 luokan kasvain, voidaan potilaan seurantaväliä pidentää. Ben 1–3 luokka mahdollistaa seurantavälin pidentämisen, sillä kasvain käyttäytyy todennäköisesti WHO:n graduksen 1 kasvaimen tapaisesti ja on harmittomampi. Seurantavälin pidentäminen

mahdollistaa potilaan elämänlaadun paranemisen tarpeettomien kontrollikäyntien poistuessa, joka mahdollistaa myös kustannusten laskun sairaalalle.

Tämän tutkielman aineiston potilaista lähes puolella (47 %) on pienempi riski meningeoman uusiutumiselle ja heidän seurantaväliänsä voitaisiin pidentää. Lopuilla potilailla (53 %) uusiutumisriksi pysyi ennallaan ja heidän seurantaväliänsä pysyisivät ennallaan. Tutkielman potilasaineistosta ei löytynyt yhtään Malignant metylaatioluokan meningeomaa lukuun ottamatta näytettä #14, josta löytyi mahdollinen *CDKN2A* deleetio. Jos deleetio todettaisiin jatkotutkimuksissa todelliseksi, nousisi näytteen metylaatioluokka WHO:n gradus 3:een ja Mal-metylaatioluokkaan, jolloin potilaan seuranta tihennettäisiin. Tutkielmassa tehdyn t-SNE klusteroinnin perusteella yksikään näyte ei kuitenkaan selkeästi klusteroitunut erilleen muista, mikä tukisi sitä, ettei yksikään näyte kuulu Mal -metylaatioluokkaan.

T-SNE analyysissä referenssinäytteet jakautuivat tutkielman näytteistä selkeästi erilleen. Ero referenssien ja näytteiden välillä on todellista eroa metylaatiassa, sillä klusterointia varten datasta suodatettiin pois oligot, joilla ei ollut intensiteettiä arvoa vinouman poistamiseksi. Klusteroinnissa näkyi nykyisilläkin referensseillä eroa eri metylaatioluokkien välillä. Ben-metylaatioluokat erkanivat selkeästi Int-metylaatioluokista ja myös alaluokat Ben-1 ja -2 sekä Int-A, Int-B ja Int-A/B luokat erotettiin toisistaan. Brain Classifier -luokittelualgoritmi ei kyennyt määrittämään näytteelle #2 tarkkaa metylaatioluokkaa Int-A:n ja -B:n väliltä, mutta t-SNE klusteroinnin perusteella näyte on enemmän Int-B luokkaan kuuluva.

Klusterointia voisi parantaa sillä, että käyttäisi ainoastaan suomalaisia näytteitä, jotka on tehty samalla mikrosirulla. Lisäksi muiden kasvaintyyppien lisääminen referensseiksi voisi parantaa klusterointia, sillä silloin saataisiin enemmän eroavaisuuksia eri klustereiden välille. Tämän tutkielman referenssien ja näytteiden eroavaisuudet voivat osittain johtua myös siitä, että referenssit ja näytteet ovat maantieteellisesti eri alkuperää. Tutkimuslupien ja näytteiden vähäisyyden vuoksi tässä tutkielmassa referensseinä käytettiin ainoastaan julkisista lähteistä saatavia näytteitä.

4.4 Eettiset näkökulmat meningeomien luokittelusta tekoälyn avulla

Käytettyjen tekoälymenetelmien eettisyyttä voidaan tutkia Cauhan & Gullapallin (2021) esittämistä läpinäkyvyyden, vastuun sekä valvottavuuden näkökulmista. Brain Classifier -algoritmin läpinäkyvyyttä voidaan pitää lähtökohtaisesti hyvänä. Capper ym. (2018a) esittävät artikkelissaan kattavasti taustalla toimivan satunnaisen metsäalgoritmin ja sen toimintaperiaatteet sekä kehityksen aikaisen referenssiaineiston (2801 näytettä). Harmillista kuitenkin on siinä, että nykyisen 12.8 version referenssiaineistoa (7495 näytettä) ei ole julkisesti saatavilla. Oletettavasti suurempi referenssiaineisto mahdollistaa luokittelijan luotettavamman toiminnan, mutta luokittelijan käyttäjille olisi silti suotavaa ilmoittaa miten referenssiaineisto esimerkiksi jakautuu eri aivokasvainten välillä ja onko osa kasvaimista yli- tai aliedustettuja.

Vastuun kantaminen tekoälymenetelmiä käyttäessä on yksiselitteisempää kuin läpinäkyvyyden pohdinta. Luokittelijalla saatujen tulosten lausumisesta vastuussa on aina diagnoosin tekevä neuropatologi, jonka tulee käyttää tekoälymenetelmillä saatuja tuloksia suuntaa antavina eikä absoluuttisena totuutena. Luokittelijan antaman metylaatioluokan tuloksen on myös oltava yhtenevä kopiolumuutosten, jotta se muuttaisi kasvaimen gradusta suhteessa histologian perusteella tehtyyn luokitukseen, kuten Sahm ym. (2024) totesivat cIMPACT-katsauksessaan.

Edellä mainitut selkeät ohjeet mahdollistavat myös Cauhan & Gullapallin (2021) esittämän kolmannen näkökulman, valvottavuuden, tehokkaamman toteuttamisen. Tekoälymenetelmien eettisyyden valvontaa helpottaa se, että tekoälyä käsitteleville klinikoille, kuten neuropatologeille, on olemassa selkeät ohjeistukset. Brain Classifier -luokittelijan valvontaa edistää myös heidän kattava tietosuojakäytäntö, joka noudattaa Euroopan unionin GDPR-ohjeistusta, sillä luokittelija sijaitsee Saksassa.

4.5 Yhteenveto

Tutkimusmenetelmä soveltuu hyvin meningeomien metylaatioprofiilin selvittämiseen ja validoinnin myötä menetelmää voidaan luotettavasti käyttää Tyks genomiikan laboratorion rutiinidiagnostiikassa. Prospektiivisen riskiarvioinnin perusteella menetelmän suurimmat riskit liittyvät näytteiden sekaannukseen ja riskipaikkojen prospektiivisen tunnistuksen myötä Tyks genomiikan laboratoriossa voidaan paremmin hallita menetelmään liittyviä riskejä. Myös Brain Classifier -luokittelijan toimimattomuus tunnistettiin yhdeksi suurimmista riskitekijöistä.

Meningeomien metylaatioprofilointia ei ole aikaisemmin tutkittu suomalaisilla potilailla ja tutkielmassa validoitu menetelmä tuottaa arvokasta tietoa meningeomien luokittelusta valtakunnallisesti. Aikaisemmin metylaatioprofilointitutkimukset on Tyksissä tilattu Tanskasta ennen menetelmän kotiuttamista. Metylaatioprofiloinnin avulla voidaan jatkossa myös tutkia muiden kasvaimien, kuten sarkoomien, luokittelua metylaation perusteella ja sen käyttö diagnostiikassa on todella arvokasta. Potilasaineiston kerääntymisen myötä metylaatioprofiloinnissa voidaan käyttää myös t-SNE klusterointia apuna selvittämään potilaan kasvaintyyppiä.

5 Kiitokset

Kiitän kaikkia ohjaajiani Turun yliopistollisesta keskussairaalan genomiikan laboratoriosta LT, Dos. Veli Kairistoa, LL Eva-Maria Talvitietä, FM Jenni Tuomista sekä Turun yliopistosta ohjaajaani FT Heidi Viitaniemeä erinomaisesta ohjauksesta graduni aikana. Kiitän myös Turun yliopistollisen keskussairaalan genomiikan laboratorion henkilökuntaa, etenkin Ville Mäkelää ja Juha-Matti Liesegangia avusta graduni laboratoriovaiheessa ja näytteiden uusimisesta.

Lähteet

- Adeeb, N., Deep, A., Griessenauer, C. J., Mortazavi, M. M., Watanabe, K., Loukas, M., Tubbs, R. S., & Cohen-Gadol, A. A. (2013). The intracranial arachnoid mater: a comprehensive review of its history, anatomy, imaging, and pathology. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 29(1), 17–33. <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1910-x>
- Beroukhi, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., Mc Henry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y.-J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., & Weir, B. A. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463(7283), 899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J.-B., & Shen, R. (2011). High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98(4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2011.07.007>
- Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32. <https://doi.org/10.1023/a:1010933404324>
- Capper, D., Jones, D. T. W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D. E., Kratz, A., Wefers, A. K., Huang, K., Pajtler, K. W., Schweizer, L., Stichel, D., Olar, A., Engel, N. W., Lindenberg, K., & Harter, P. N. (2018a). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*, 555(7697), 469–474. <https://doi.org/10.1038/nature26000>
- Capper, D., Stichel, D., Sahm, F., Jones, D. R., Schrimpf, D., Sill, M., Schmid, S., Hovestadt, V., Reuss, D. E., Koelsche, C., Reinhardt, A., Wefers, A. K., Huang, K., Sievers, P., Ebrahimi, A., Schöler, A., Teichmann, D., Koch, A., Hänggi, D., & Unterberg, A. (2018b). Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathologica*, 136(2), 181–210. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1879-y>
- Chauhan, C., & Gullapalli, R. R. (2021). Ethics of AI in Pathology: Current Paradigms and Emerging Issues. *The American Journal of Pathology*, 191(10), 1673–1683. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.06.011>

- Chen, Y., Hong, T., Wang, S., Mo, J., Tian, T., & Zhou, X. (2017). Epigenetic modification of nucleic acids: from basic studies to medical applications. *Chemical Society Reviews*, 46(10), 2844–2872. <https://doi.org/10.1039/c6cs00599c>
- Daenekas, B., Pérez, E., Boniolo, F., Stefan, S., Benfatto, S., Sill, M., Sturm, D., Jones, D. T. W., Capper, D., Zapatka, M., & Hovestadt, V. (2024). Conumee 2.0: Enhanced copy-number variation analysis from DNA methylation arrays for humans and mice. *Bioinformatics*, 40(2). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btae029>
- Fernandez, A. F., Assenov, Y., Martin-Subero, J. I., Balint, B., Siebert, R., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hidalgo, M., Tan, A.-C., Galm, O., Ferrer, I., Sanchez-Cespedes, M., Villanueva, A., Carmona, J., Sanchez-Mut, J. V., Berdasco, M., Moreno, V., Capella, G., Monk, D., & Ballestar, E. (2011). A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Research*, 22(2), 407–419. <https://doi.org/10.1101/gr.119867.110>
- Gnanapragasam, V. J. (2010). Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU International*, 105(2), 274–278. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410x.2009.08665.x>
- Goldbrunner, R., Stavrinou, P., Jenkinson, M. D., Sahm, F., Mawrin, C., Weber, D. C., Preusser, M., Minniti, G., Lund-Johansen, M., Lefranc, F., Houdart, E., Sallabanda, K., Le Rhun, E., Nieuwenhuizen, D., Tabatabai, G., Soffietti, R., & Weller, M. (2021). EANO guideline on the diagnosis and management of meningiomas. *Neuro-Oncology*, 23(11), 1821–2834. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab150>
- Goodfellow, I., Bengio, Y., & Courville, A. (2016). *Deep Learning*. The MIT Press. <https://www.deeplearningbook.org/>
- Halabi, R., Dakroub, F., Haider, M. Z., Patel, S., Amhaz, N. A., Reslan, M. A., Eid, A. H., Mechref, Y., Darwiche, N., Kobeissy, F., Omeis, I., & Shaito, A. A. (2023). Unveiling a Biomarker Signature of Meningioma: The Need for a Panel of Genomic, Epigenetic, Proteomic, and RNA Biomarkers to Advance Diagnosis and Prognosis. *Cancers*, 15(22), 5339–5339. <https://doi.org/10.3390/cancers15225339>
- Hamet, P., & Tremblay, J. (2017). Artificial intelligence in medicine. *Metabolism*, 69(69), S36–S40. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.01.011>
- Hastings, P. J., Lupski, J. R., Rosenberg, S. M., & Ira, G. (2009). Mechanisms of change in gene copy number. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 551–564. <https://doi.org/10.1038/nrg2593>

- Ichwan, S., Santoso, F., Aman, R. A., Tandian, D., Fachniadin, A., & Nugroho, S. W. (2023). Estrogen and progesterone in meningioma: Bridging the gap of knowledge. *Neurology Asia*, 28(1), 1–11. <https://doi.org/10.54029/2023wxj>
- Jaunmuktane, Z., Capper, D., Jones, D. T. W., Schrimpf, D., Sill, M., Dutt, M., Suraweera, N., Pfister, S. M., von Deimling, A., & Brandner, S. (2019). Methylation array profiling of adult brain tumours: diagnostic outcomes in a large, single centre. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0668-8>
- Kaur, D., Lee, S. M., Goldberg, D., Spix, N. J., Hinoue, T., Li, H.-T., Dwaraka, V. B., Smith, R., Shen, H., Liang, G., Renke, N., Laird, P. W., & Zhou, W. (2023). Comprehensive evaluation of the Infinium human MethylationEPIC v2 BeadChip. *Epigenetics Communications*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s43682-023-00021-5>
- Kroll, J. A. (2020). *The Oxford Handbook Of Ethics Of AI* (M. Dubber, F. Pasquale, & S. Das, Eds.; pp. 181–196). Oxford Univ Press Us. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780190067397.001.0001>
- Lahtz, C., & Pfeifer, G. P. (2011). Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of Molecular Cell Biology*, 3(1), 51–58. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq053>
- Maas, S. L. N., Stichel, D., Hielscher, T., Sievers, P., Berghoff, A. S., Schrimpf, D., Sill, M., Euskirchen, P., Blume, C., Patel, A., Dogan, H., Reuss, D., Dohmen, H., Stein, M., Reinhardt, A., Suwala, A. K., Wefers, A. K., Baumgarten, P., Ricklefs, F., & Rushing, E. J. (2021). Integrated Molecular-Morphologic Meningioma Classification: A Multi-center Retrospective Analysis, Retrospectively and Prospectively Validated. *Journal of Clinical Oncology*, 39(34), 3839–3852. <https://doi.org/10.1200/jco.21.00784>
- Maggio, I., Franceschi, E., Tosoni, A., Nunno, V. D., Gatto, L., Lodi, R., & Brandes, A. A. (2021). Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. *CNS Oncology*, 10(2). <https://doi.org/10.2217/cns-2021-0003>
- Marastoni, E., & Barresi, V. (2024). Atypical meningioma: Histopathological, genetic, and epigenetic features to predict recurrence risk. *Histol Histopathol*, 39, 293–302. <https://doi.org/10.14670/hh-18-670>
- Marosi, C., Hassler, M., Roessler, K., Reni, M., Sant, M., Mazza, E., & Vecht, C. (2008). Meningioma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 67(2), 153–171. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.01.010>
- Millesi, M., Ryba, A. S., Hainfellner, J. A., Roetzer, T., Berghoff, A. S., Preusser, M., Heller, G., Tomasich, E., Sahm, F., Roessler, K., & Wolfsberger, S. (2022). DNA Methylation

- Associates With Clinical Courses of Atypical Meningiomas: A Matched Case–Control Study. *Frontiers in Oncology*, 12(811729). <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.811729>
- Miyata, K., Naito, M., Miyata, T., Mokuda, S., & Asahara, H. (2017). Bisulfite Sequencing for DNA Methylation Analysis of Primary Muscle Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 1668, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7283-8_1
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Noguera-Castells, A., García-Prieto, C. A., Álvarez-Errico, D., & Esteller, M. (2023). Validation of the new EPIC DNA methylation microarray (900K EPIC v2) for high-throughput profiling of the human DNA methylome. *Epigenetics*, 18(1). <https://doi.org/10.1080/15592294.2023.2185742>
- Pajtler, K. W., Witt, H., Sill, M., Jones, D. T. W., Hovestadt, V., Kratochwil, F., Wani, K., Tatevossian, R., Punchihewa, C., Johann, P., Reimand, J., Warnatz, H.-J., Ryzhova, M., Mack, S., Ramaswamy, V., Capper, D., Schweizer, L., Sieber, L., Wittmann, A., & Huang, Z. (2015). Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer Cell*, 27(5), 728–743. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.002>
- Pećina-Šlaus, N. (2013). Merlin, the NF2 Gene Product. *Pathology & Oncology Research*, 19(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s12253-013-9644-y>
- Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- Pös, O., Radvanszky, J., Buglyó, G., Pös, Z., Rusnakova, D., Nagy, B., & Szemes, T. (2021). DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. *Biomedical Journal*, 44(5), 548–559. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.02.003>
- Pratt, D., Sahm, F., & Aldape, K. (2021). DNA methylation profiling as a model for discovery and precision diagnostics in neuro-oncology. *Neuro-Oncology*, 23(Supplement_5), S16–S29. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab143>
- Rajkomar, A., Dean, J., & Kohane, I. (2019). Machine Learning in Medicine. *New England Journal of Medicine*, 380(14), 1347–1358. <https://doi.org/10.1056/nejmra1814259>
- Sahm, F., Aldape, K. D., Brastianos, P. K., Brat, D. J., Dahiya, S., von Deimling, A., Giannini, C., Gilbert, M. R., Louis, D. N., Raleigh, D. R., Reifenberger, G., Santagata, S., Sarkar,

- C., Zadeh, G., Wesseling, P., & Perry, A. (2024). cIMPACT-NOW Update 8: Clarifications on molecular risk parameters and recommendations for WHO grading of meningiomas. *Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noae170>
- Sahm F, Perry A, on Deimling A, Claus A.B., Mawrin C, Brastianos PK, Santagata S. Meningioma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021 [viitattu 2024/10/09]. (*WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6*). <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/45>.
- Sahm, F., Schrimpf, D., Stichel, D., Jones, D. T. W., Hielscher, T., Schefzyk, S., Okonechnikov, K., Koelsche, C., Reuss, D. E., Capper, D., Sturm, D., Wirsching, H.-G., Berghoff, A. S., Baumgarten, P., Kratz, A., Huang, K., Wefers, A. K., Hovestadt, V., Sill, M., & Ellis, H. P. (2017). DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *The Lancet Oncology*, *18*(5), 682–694. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(17\)30155-9](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(17)30155-9)
- Shen, E., Leclair, N. K., Herlth, K., Soucy, M., Renzette, N., Zhuo, X., Kelly, K., Omerza, G., Onyiuke, H., McNeill, I., Wolansky, L., Becker, K., Li, L., Wu, Q., & Bulsara, K. R. (2023). DNA methylation provides diagnostic value for meningioma recurrence in clinical practice. *Acta Neurochirurgica*, *165*(5), 1323–1331. <https://doi.org/10.1007/s00701-023-05550-5>
- Tollefsbol, T. (2023). *Handbook of Epigenetics: the new molecular and medical genetics* (3. painos). Elsevier Science & Technology
- Urbano, A., Smith, J., Weeks, R. J., & Chatterjee, A. (2019). Gene-Specific Targeting of DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cancers*, *11*(10), 1515. <https://doi.org/10.3390/cancers11101515>

Liitteet

Liite 1. Kopiolukuanalyysin R-komennot

```
# GRADUN R-KOMENNOT
#####
# KAIKKI KÄYTETYT PAKETIT
if (!require("BiocManager", quietly = TRUE))
  install.packages("BiocManager")
BiocManager::install("sesame")
devtools::install_github("hovestadtlab/conumee2", subdir = "conumee2")
install.packages("Rtsne")
library(sesame)
sesameDataCache("") #vain kerran per R-ohjelmisto
library(conumee2)
library(Rtsne)
library(ggplot2)
#####

#####
#Kopiolukuanalyysi conumee 2.0 paketilla
#####

#Käsitellään kontrollit haluttuun muotoon, käsittelyn apuna käytetty Chat
GPT -tekoälyä
df <- read.table("GSE222919_signal_intensities.txt", header = TRUE, sep =
"\t")
new_df <- df[, c(1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14)] #Halutut keuhkokudosnäytteet
näissä kolumneissa
write.csv(new_df, "kontrollit2.csv", row.names = FALSE) #Luodaan csv-tie-
dosto, jotta kontrollit pysyvät tallessa

#Ladataan IDAT-tiedostot sekä näytteistä ja avataan kontrollitiedosto
sdfs.q <- openSesame("näyte_kansio", prep = "QCDPB", func = NULL)
kontrollit = read.csv("kontrollit2.csv", header = TRUE, sep = ",")

#yhdistetään intensiteettiärvot sekä näytteille että kontrolleille
data.q <- CNV.load(do.call(cbind, lapply(sdfs.q, totalIntensities)))
data.c <- CNV.load(kontrollit)
data.q
data.c

#Luodaan annotaatioprojekti
data(exclude_regions)
data(detail_regions.hg38) #Käytetään detail_regions.hg38, sillä se on
EPICv2-näytteille
detail_regions
anno <- CNV.create_anno(array_type = c("EPICv2"), exclude_regions = ex-
clude_regions, detail_regions = detail_regions)
anno

#Segmentoidaan genomi
x <- CNV.fit(data.q, data.c, anno)
```

```

x <- CNV.bin(x)
x <- CNV.detail(x)
x <- CNV.segment(x)

#Fokaaliset CNV muutokset
x <- CNV.focal(x)

#Piirretään kuvaajat. Vaihtoehtoina on koko genomin alueelta
(CNV.genomeplot) tai yksittäisten geenien alueelta (CNV.detailplot, jolla
määritetään geeni)
CNV.genomeplot(x)
CNV.detailplot(x, name = "Geenin_nimi")

#Piirretään yhteenvetokuvaajat metylaatioluokille Ben-1, Ben-2 ja Int
CNV.summaryplot(x) #Yhteenvetokuvaajia varten ei tehty fokaalisten CNV
muutoksien kommentia

#####
#t-SNE analyysi
#####

#Avataan näytteet ja tehdään normalisointi
betas <- openSesame("näytteet", prep = "QCDPB", func = getBetas)

# Convert the list to a data frame (this will pad with NAs as needed)
#ChatGPT:n kirjoittama komento, jolla saadaan referensseistä puuttuville
probeille NA arvo tyhjän solun sijaan
betas_df <- do.call(rbind, lapply(betas, function(x) {
  length(x) <- max(sapply(betas, length)) # Pad each vector
  return(x)
}))

#Poistetaan kolumnit, joissa on NA-arvoja. ChatGPT:n kirjoittama komento,
jota muokattu sopivammaksi
betas_df_clean <- betas_df[, colSums(is.na(betas_df)) == 0]

#Lasketaan probeille keskihajonta, järjestetään ne sen mukaisesti ja va-
litaan 500 probea, joilla isoin keskihajonta
probe_sd <- apply(betas_df_clean, 2, sd, na.rm=TRUE)
sorted_probe_sd <- sort(probe_sd, decreasing = TRUE)
most_variable500_probes <- names(sorted_probe_sd[1:500])
View(most_variable500_probes)
writeLines(most_variable500_probes, "500bestprobe.txt") #tallennetaan
probelista myöhempää käyttöä varten

probet_analyysiin <- betas_df_clean[, most_variable500_probes]
taulukko <- probet_analyysiin
View(taulukko)

#Poistetaan referensseistä GSM-etuliite ja sortataan näytteet metylaatio-
luokituksen/WHO luokituksen lisäämiseksi.
rownames_taulukko <- rownames(taulukko)
rownames_taulukko[18:length(rownames_taulukko)] <- sub("^([_]+)", "",
rownames_taulukko[18:length(rownames_taulukko)]) #ChatGPT:n kirjoittama
komento

```

```

rownames(taulukko) <- rownames_taulukko
taulukko_sortattu <- taulukko[order(rownames(taulukko)), ]

write.csv(taulukko_sortattu, file = "sortattu_näytteet_500_NA.rm.csv",
row.names = TRUE) #tallennetaan taulukko myöhempää käyttöä varten
taulukko <- read.csv("sortattu_näytteet_500_NA.rm.csv")
#Lisätään näytteisiin metylaatioluokka ja referensseihin WHO-luokitus
taulukko$Grade <- c("Int-A", "Int-A/B", "Ben-1", "Ben-2", "Int-A", "Int-
A", "Ben-2", "Ben-1", "Ben-2", "Ben-1", "Ben-1", "Int-A", "Int-A", "Int-A", "Int-
B", "Ben-1", "Int-A", "WHO II", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I",
"WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I",
"WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I",
"WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I",
"WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I",
"WHO II", "WHO I", "WHO II", "WHO I", "WHO II", "WHO II", "WHO II", "WHO
II", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO
II", "WHO I", "WHO I", "WHO III", "WHO III", "WHO III", "WHO III", "WHO
III", "WHO II", "WHO III", "WHO III", "WHO II", "WHO II", "WHO II", "WHO II", "WHO
II", "WHO I", "WHO II", "WHO I", "WHO II", "WHO I", "WHO II", "WHO II",
"WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I", "WHO I")
taulukko_analyysiin <- taulukko[, -1] #poistetaan näytenimi kolumni t-SNE
analyysiä varten

#t-SNE analyysi Rtsne:n avulla
set.seed(70) #tuloksien toistettavuutta varten
tsne_out <- Rtsne(taulukko_analyysiin)

#Piiirretään kuvaaja ggplot2:n avulla
color_palette <- c(
  "Ben-1" = "#E69F00",
  "Ben-2" = "#FFD100",
  "Int-A" = "#0072B2",
  "Int-A/B" = "#00CFFF",
  "Int-B" = "#009",
  "WHO I" = "#FF7777",
  "WHO II" = "#E30000",
  "WHO III" = "#8c0000"
)
tsne_plot <- data.frame(x = tsne_out$Y[,1], y = tsne_out$Y[,2], Luokitus
= taulukko_analyysiin$Grade)
p <- ggplot(tsne_plot) + geom_point(aes(x=x, y=y, color=Luokitus)) +
scale_color_manual(values=color_palette)
print(p)

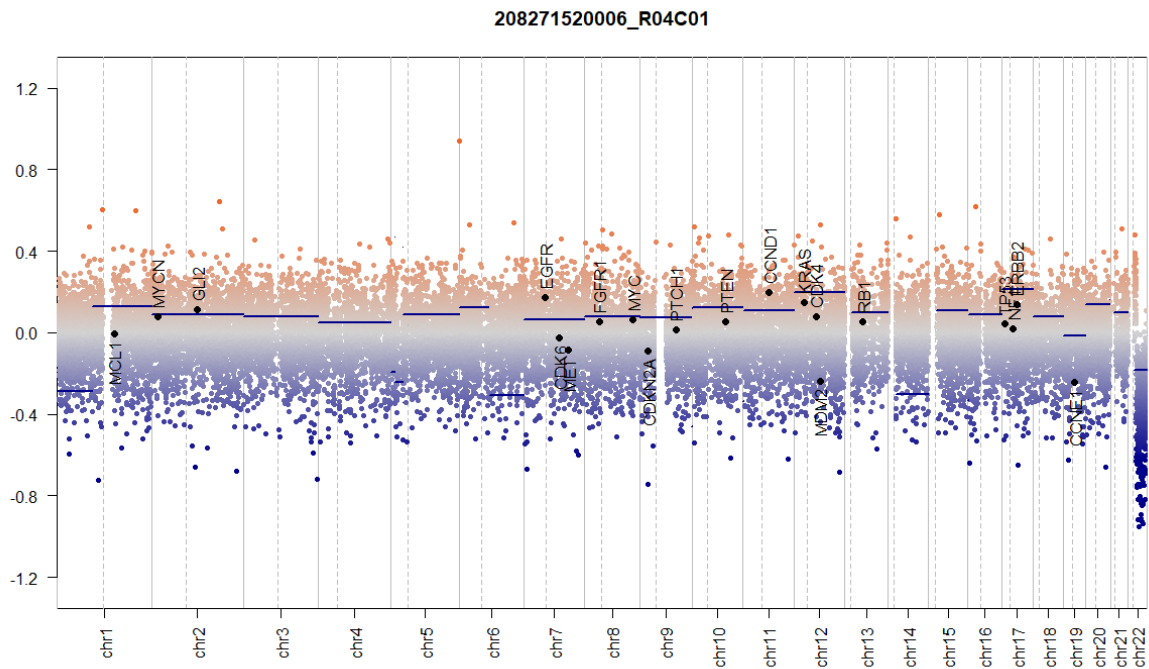
#Tarkennetaan omien näytteiden kohdalle
p_zoomed <- p +
  xlim(5, 7.5) +
  ylim(4, 6)
print(p_zoomed)

#Tallennetaan kuvaajat
ggsave("t-SNE_500_NA.rm.tiff", plot = p, dpi = 300, width = 8, height =
6, units = "in", compression = "lzw")
ggsave("t-SNE_500_zoomed_NA.rm.tiff", plot = p_zoomed, dpi = 300, width =
8, height = 6, units = "in", compression = "lzw")

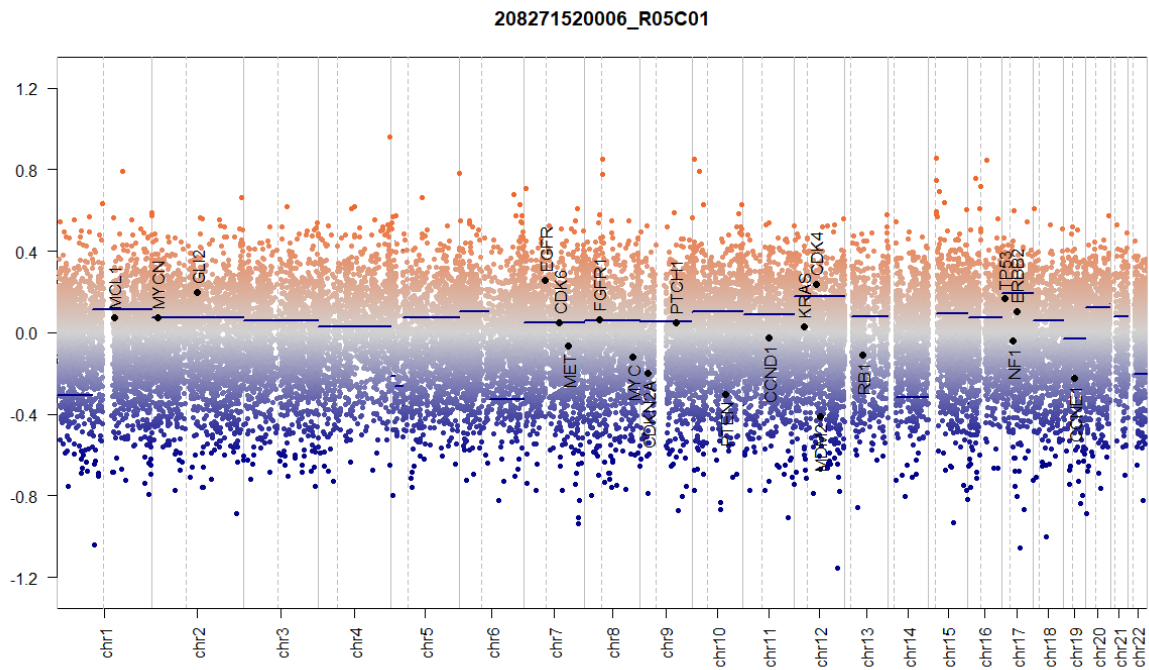
```

Liite 2. Bening-metylaatioluokan kopiulukumuutokset

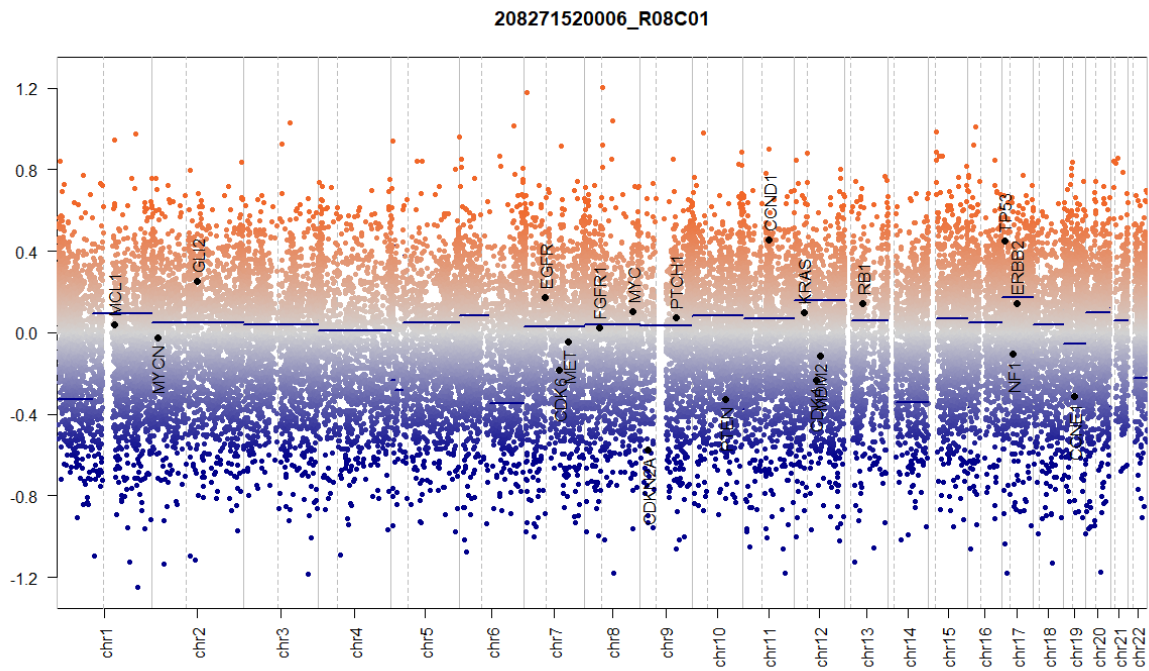
Näyte #3



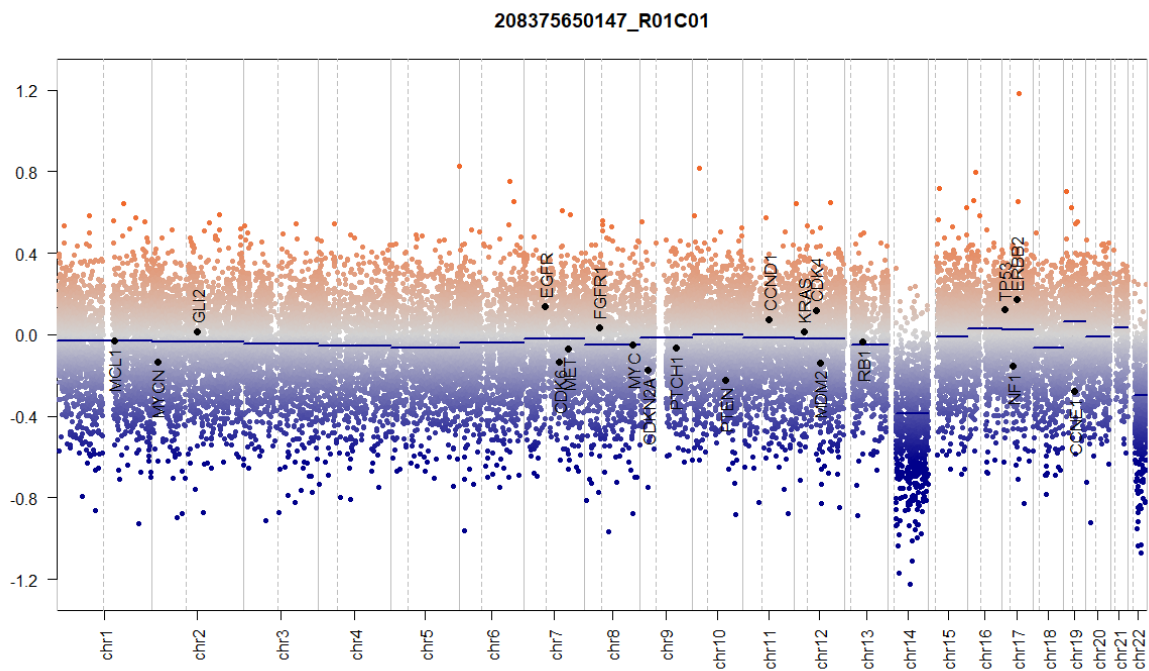
Näyte #4



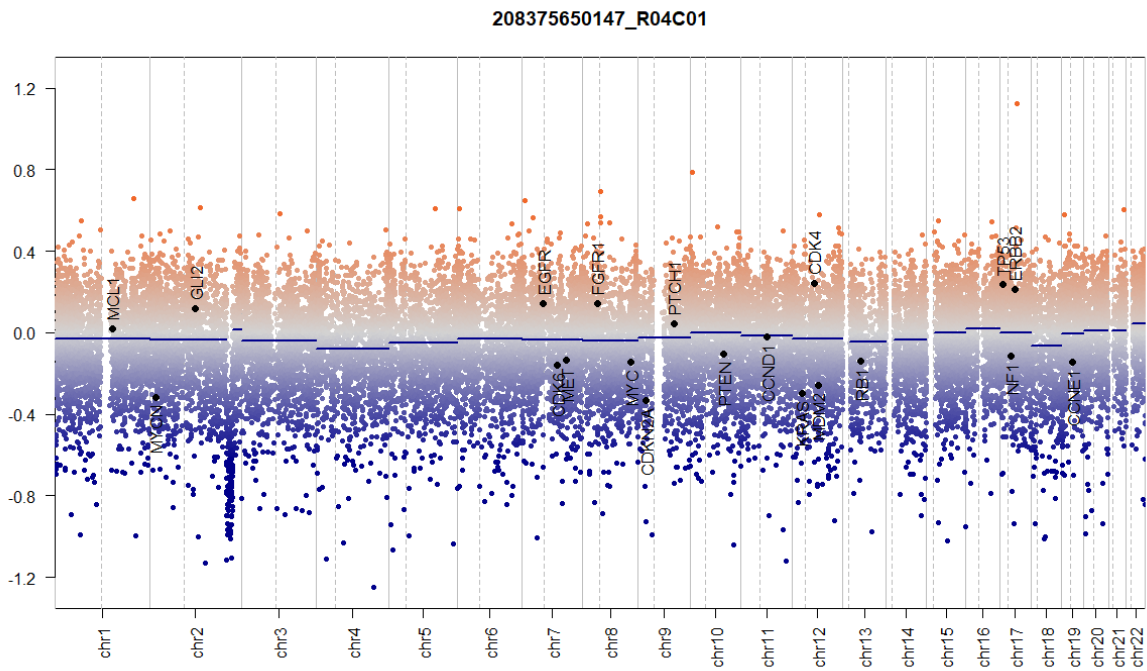
Näyte #7



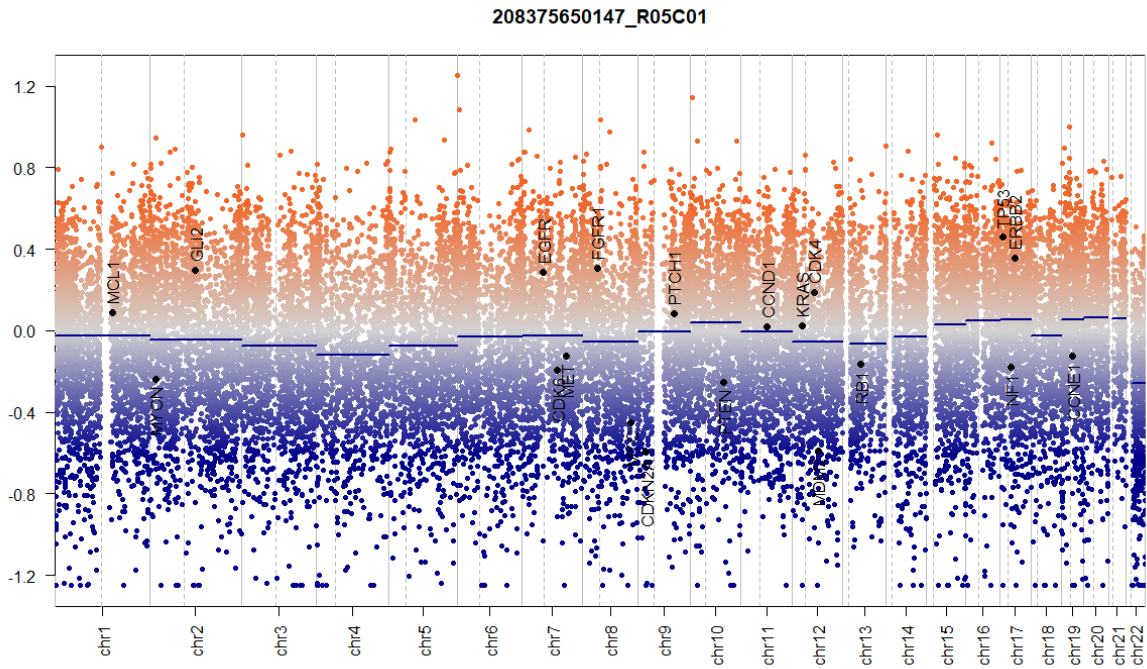
Näyte #8



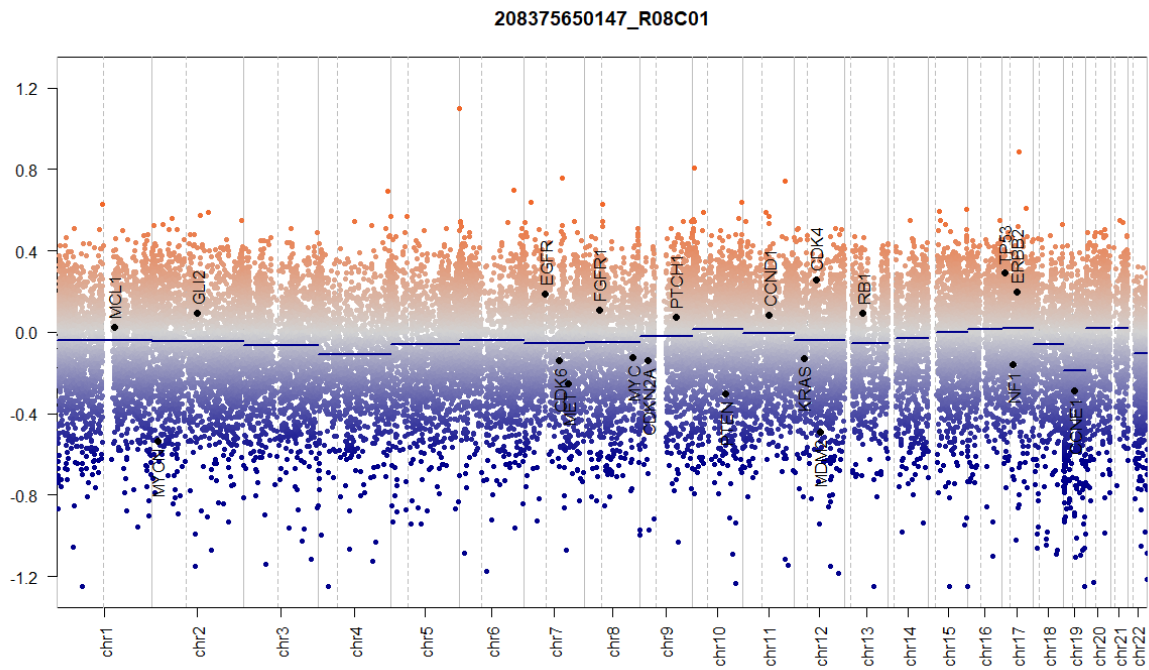
Näyte #9



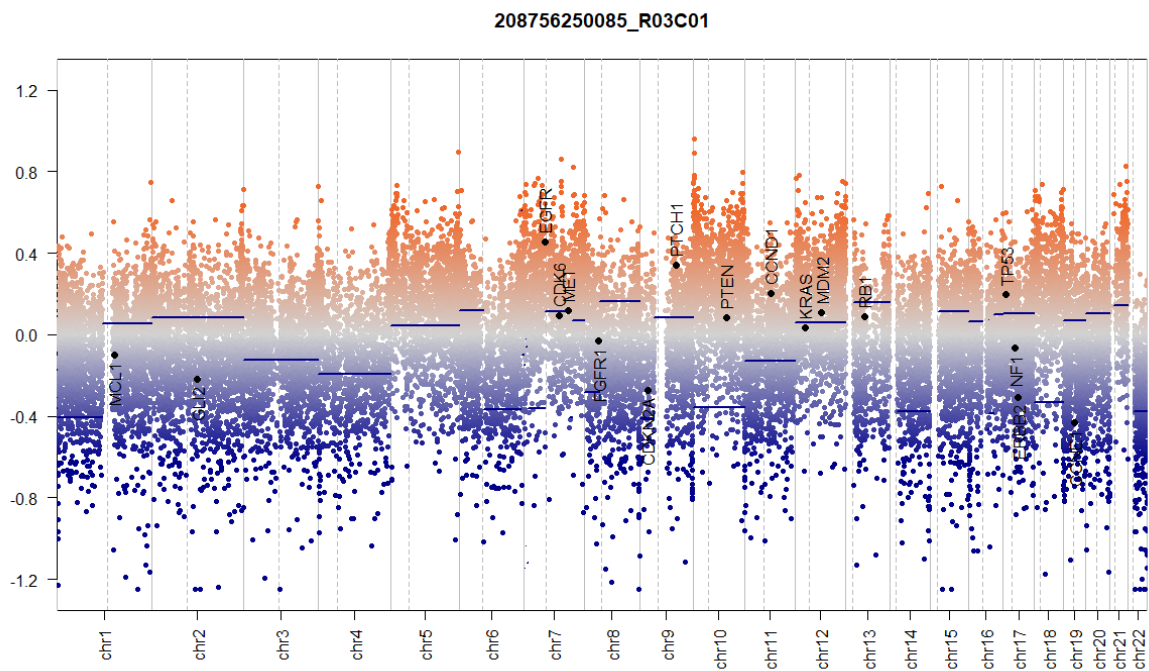
Näyte #10



Näyte #11

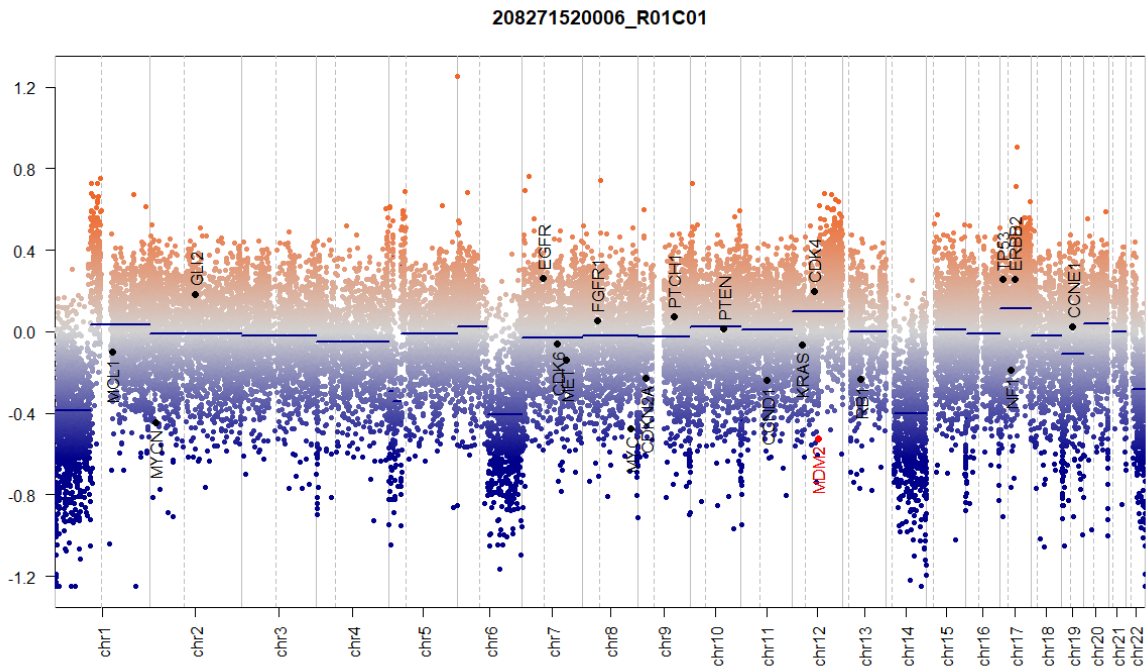


Näyte #16

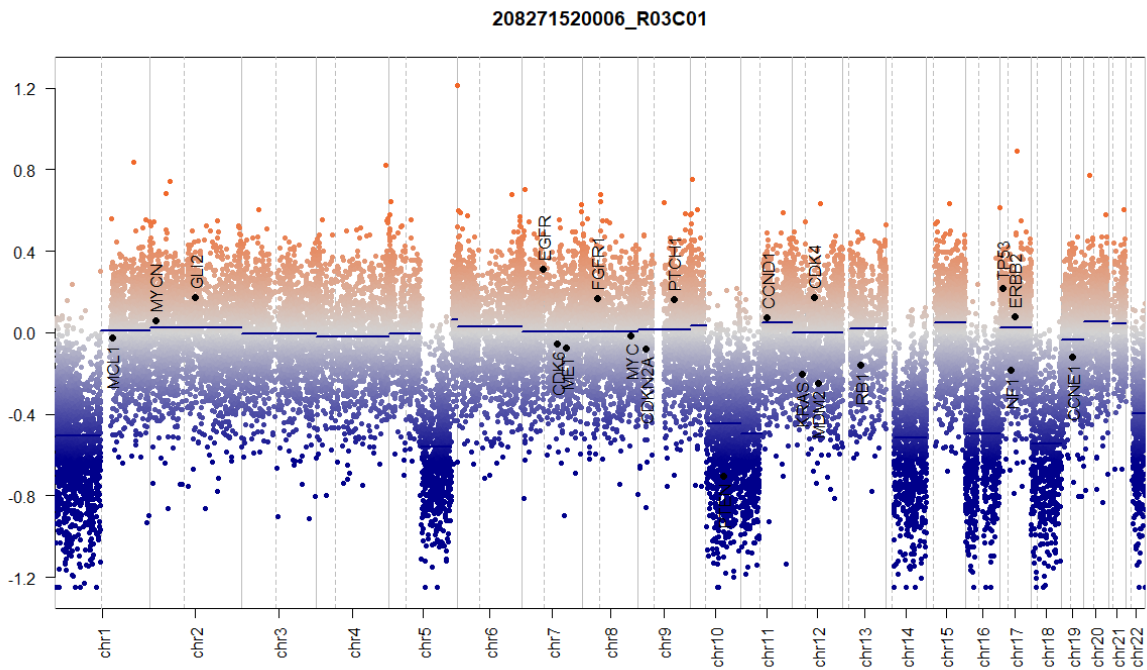


Liite 3. Intermediate-metylaatioluokkien kopiokumuutokset

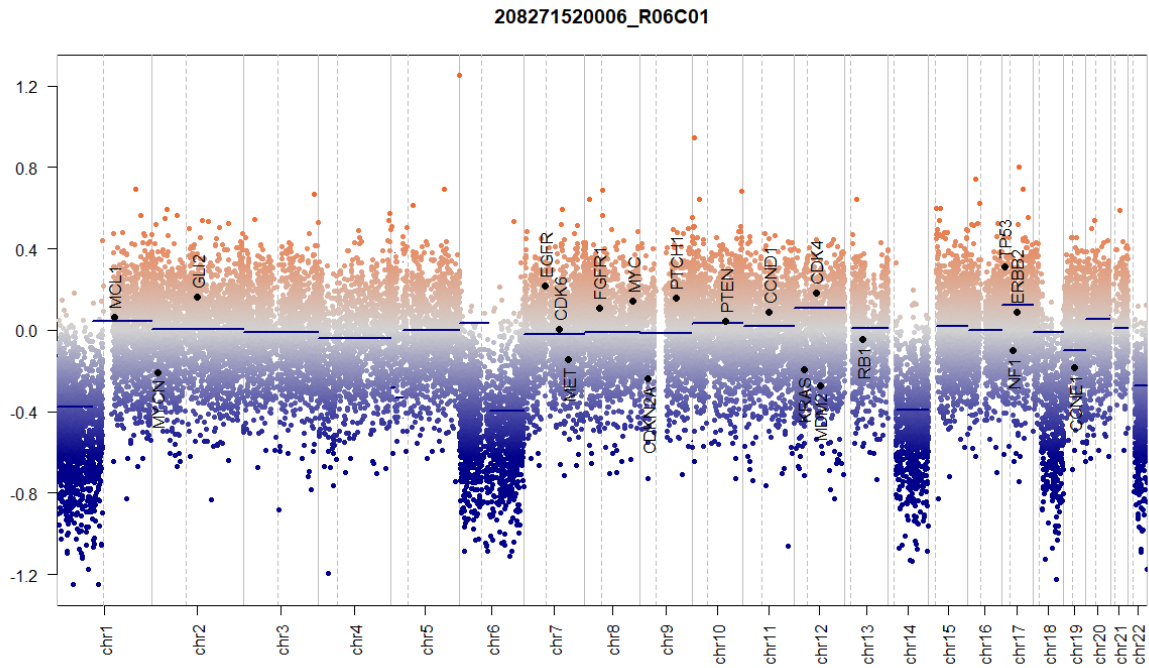
Näyte #1



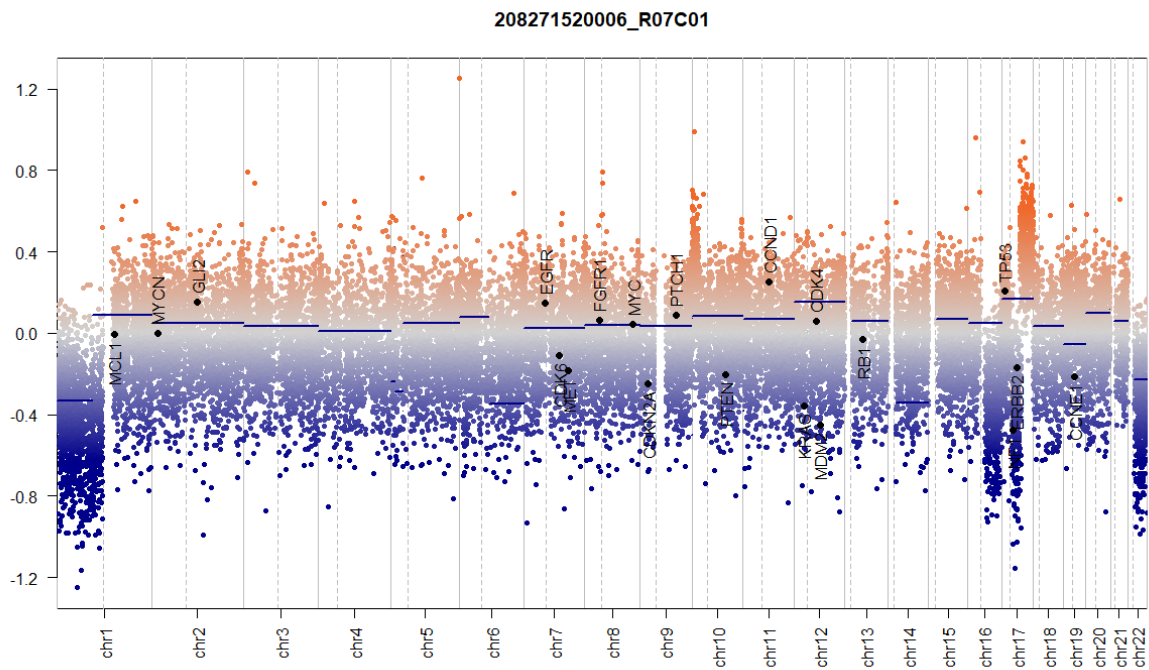
Näyte #2



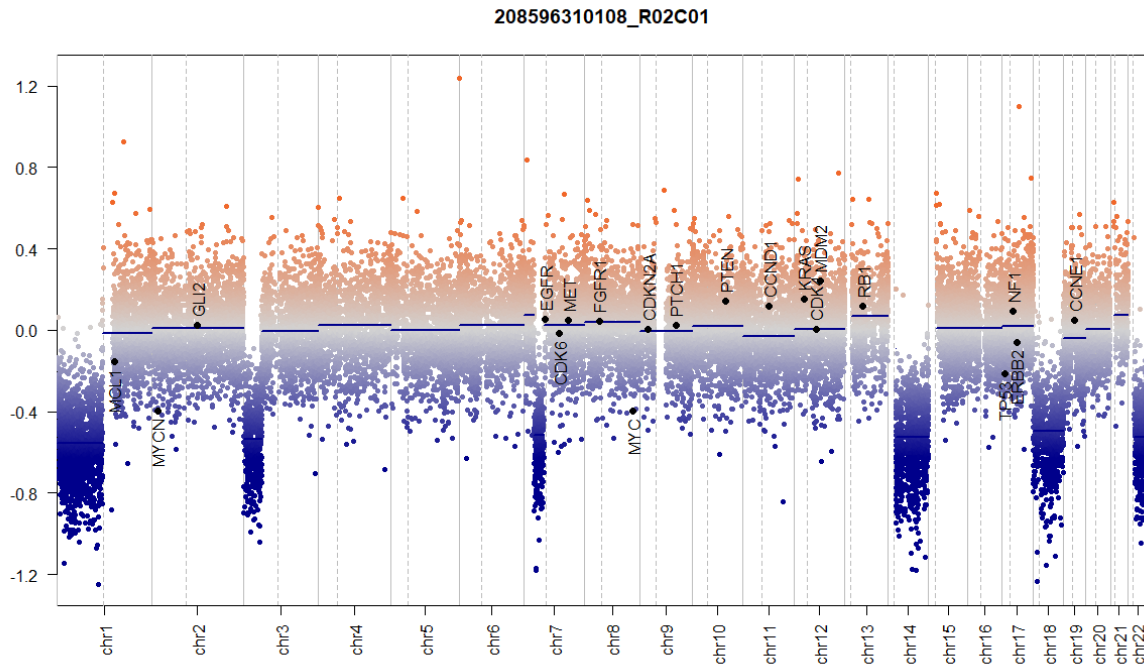
Näyte #5



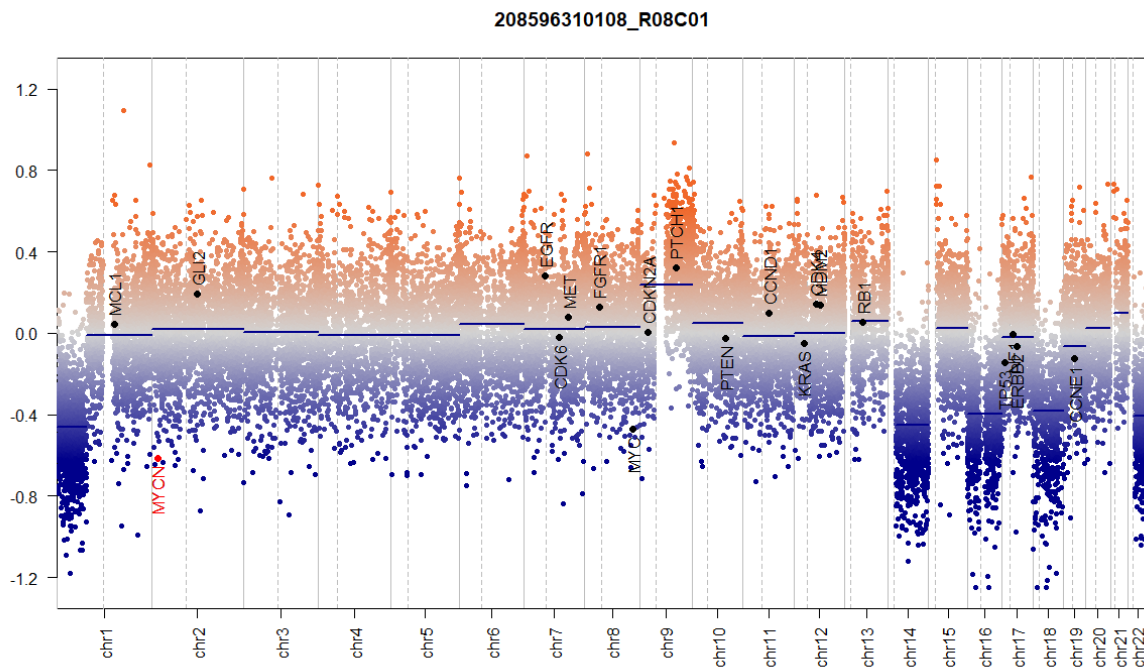
Näyte #6



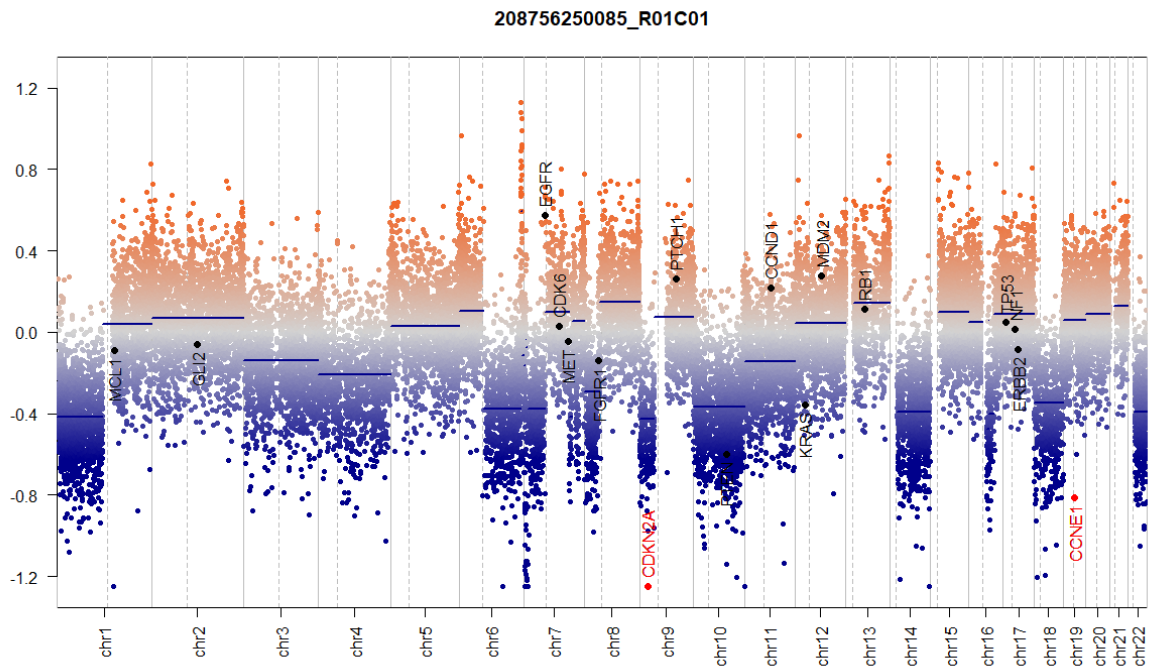
Näyte #12



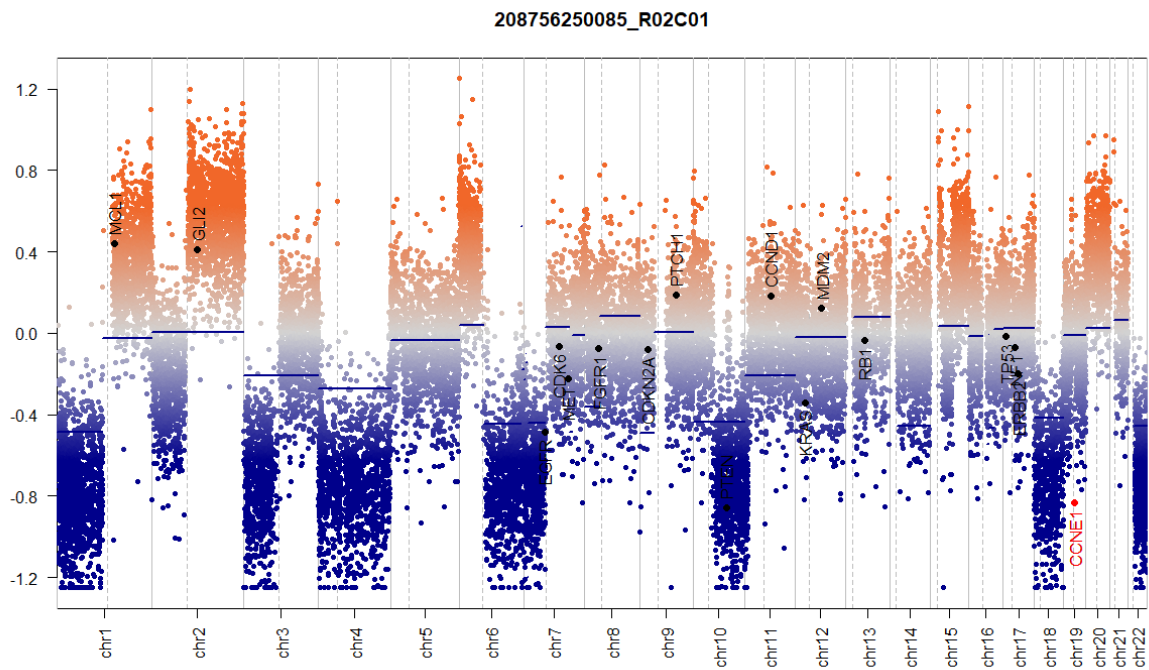
Näyte #13



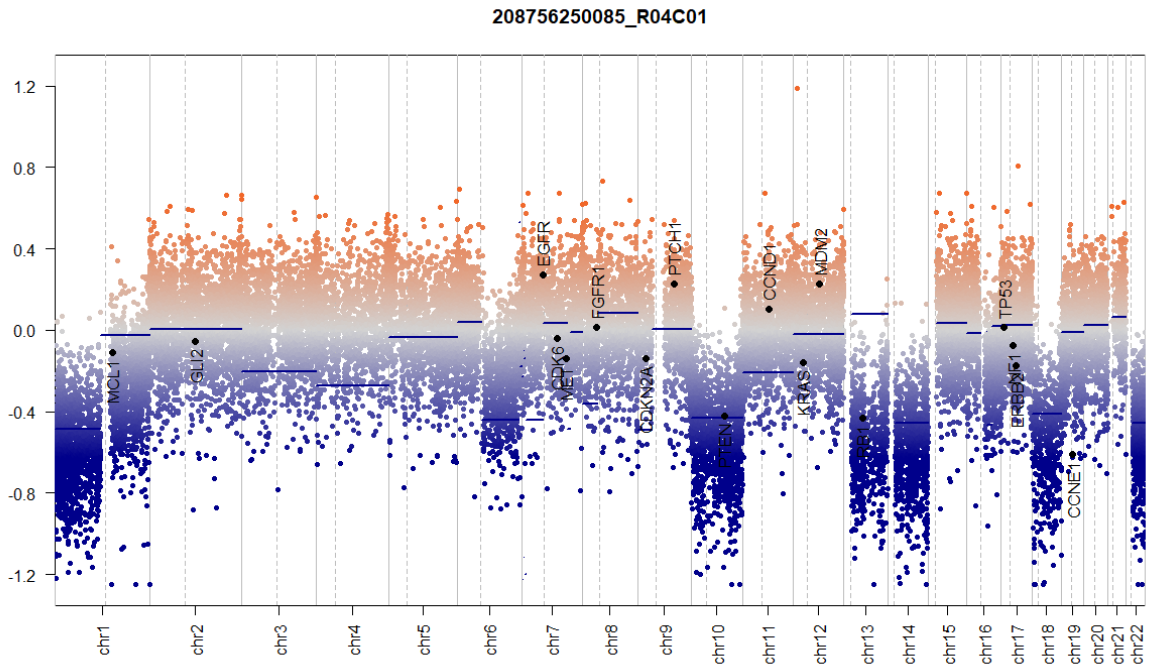
Näyte #14



Näyte #15



Näyte #17



Liite 4. ISO15189:2022 mukainen prospektiivinen riskianalyysi

Työvaihe	Riski	Riskin kuvaus	Riskin toteutumisen todennäköisyys			Toteutuneen riskin vakavuus			Kokonais-riskiluku	Ennaltaehkäisevät toimenpiteet	Korjaavat toimenpiteet, jos riski on toteutunut
			pieni	keskisuuri	suuri	pieni	keskisuuri	suuri			
Kaikki työvaiheet	Laboratoriolaitteen rikkoutuminen	Tutkimusta ei pystytä tekemään kokonaisuudessaan tai ollenkaan, tai tulos ei ole teknisesti onnistunut/hyväksyttävä. Näytteen tutkiminen ja tuloksen saaminen viivästyy.							Noudatetaan valmistajan suosituksia huolloista. Pidetään huoltosopimusta kriittisillä laitteilla. Hyvä perehdytys laitteiden käyttöön ja toiminta-tyyppien seurantaan. Pyritään kantoitamaan jo ennalta korvaavia vaihtoehtoja, varalaitteita ja alihankintalaborantia.	Nopea yhteys laitevalmistajan tekniseen tukeen tai Tyksin tekniseen tukeen. Lähetetään näyte toiseen laboratorioon tutkittavaksi tai selvitetään mahdollisuus saada korvaava laite, jos tutkimusta ei pystytä jatkamaan tai alkavissa tekemään. Ollaan tarvittaessa yhteydessä lähettävään yksikköön.	
PÄIVÄ 1											
DNA:n pitoisuuden mittaaminen ja laimennos											
Eswalmistelu vaihe 1.	Näytesekaannus	Tutkimusta tehdään väärästä näytteestä: potilas voi saada väärän tuloksen tai tuloksen saaminen ja sitä kautta hoito voi viivästyä. Tulosta ei voida vastata lainkaan. Muu analytiikka viivästyy mittavan selvitystyön vuoksi.							Tarkastetaan käsiteltävien näytteiden tunnistus huolellisesti. Varmistetaan oikeat näytteet Qpaliista ja pipetointipohjasta.	Tutkimuksen uusiminen jos virhe havaitaan ennen vastauksen kuitaamista. Jos virhe havaitaan myöhemmin, yhteydenotto lähettävään yksikköön ja tutkimuksen uusiminen. HAIPRO-ilmoituksen tekeminen.	
Eswalmistelu vaihe 1.	Väärä laimennos näytteistä	Tutkimusta ei pystytä tekemään kokonaisuudessaan tai ollenkaan, tai tulos ei ole teknisesti onnistunut/hyväksyttävä. Potilas ei saa tutkimustulosta lainkaan tai se jää osittaiseksi. Terve uuden tutkimuksen tekemiseen. Näytteen tutkiminen ja tuloksen saaminen viivästyy.						3	DNA:n pitoisuuden mittaaminen duplikaattina ja näiden keskiarvon käyttäminen laimennoslaskuissa. Laimennoslaskut pipetointipohjan Excel-kaavan mukaisesti.	Jos laboratoriolaitaja on huomannut virheen laimentamisessa, hän uusii laimennokset. Tämän riskin toteutuminen ei välttämättä tule esiin analyysivaiheessa. Tarkastetaan tuloksista onko näyte onnistunut riskin toteutumisesta huolimatta. Jos laatuparametri poikkeavat muista saajan näytteistä ja on syytä epäillä virhettä näytteen esikäsittelyssä, tutkimus uusitaan.	
Eswalmistelu vaihe 1.	Kontaminaatio näytteissä	Mahdollisesti alimukertaisen näytteen kontaminaatio.						4	Tilan ja työvälineiden puhtaudesta huolehtiminen. Puhdistus työväätteet ja hanskat, näytteiden käsitteleminen ainoastaan Pre-tiloissa.	Uusi DNA-eristys, jos mahdollista.	
Eswalmistelu vaihe 1. Eswalmistelu vaihe 2.	Kontaminaatio laimennoksiin	Tutkimusta ei pystytä tekemään kokonaisuudessaan tai ollenkaan, tai tulos ei ole teknisesti onnistunut/hyväksyttävä.						3	Huolelliset työtavat ja pipetointitekniikat. Tilan ja työvälineiden puhtaudesta huolehtiminen. Puhdistus työväätteet ja hanskat, näytteiden käsitteleminen ainoastaan Pre-tiloissa. Puhdistus DNA-vapaan veden käyttö laimennoksissa ja vesi heitetään pois laimennosten jälkeen.	Jos riskin toteutuminen havaitaan laimennosta tehdessä laimennos uusitaan ja uutta laimennosta käytetään loppututkimukseen. Jos virhe havaitaan myöhemmin, tutkimus uusitaan kokonaan.	
Eswalmistelu vaihe 1. Eswalmistelu vaihe 2.	Kontaminaatio reagensseihin	Kaikki tulevat DNA-pitoisuuden mittausten tulokset väärä. Vaikuttaa kaikkiin tutkimuksiin, joissa käytetään Qubit-mittauksia, sillä kontaminaatio nostaa standardien ja testattavien näytteiden DNA-pitoisuutta.						3	Huolelliset työtavat ja pipetointitekniikat. Tilan ja työvälineiden puhtaudesta huolehtiminen. Puhdistus työväätteet ja hanskat. Reagensseja ei käytetä stock-pulloista vaan niistä otetaan omiin näytteisiin tarvittava määrä esimerkiksi muovikaukaloon.	Kontaminoituneiden reagenssejen hävitys. Uusien reagenssien tilaaminen. Työtapojen tarkastelu. Tapahtuman tekeminen laboratoriotietojärjestelmään.	

Työvaihe	Riski	Riskin kuvaus	Riskin toteutumisen todennäköisyys				Toteutuneen riskin vakavuus			Ennaltaehkäisevät toimenpiteet	Korjaavat toimenpiteet, jos riski on toteutunut
			pieni	keskisuuri	suuri	erittäin suuri	pieni	keskisuuri	suuri		
PÄIVÄ 2											
Bisulfiittikonversio											
	Väärin ktiin käyttäminen / väärin reagenssien käyttäminen	Tutkimus epäonnistuu, potilasnäytteitä hukataan läimennöksen verran. Näytteen tutkiminen ja tuloksen saaminen viivästyy. Kustannukset lisääntyvät.								Huolelliset työtavat, työohjeen noudattaminen, perehdytys. Huolellinen varmistus oikean ktiin käytöstä. Tarkista onko pakettissa oikeat reagenssit ja niiden riittävyys.	Uusiin tutkimus oikealla ktiillä ja reagensseilla.
1.1.	Näytteiden sekaantuminen konversioprotokollalle pipetoimissa eli näyttesekaannus	Tutkimus tehdään väärästä näytteestä: potilas voi saada väärän tuloksen tai tuloksen saaminen ja sitä kautta hoito voi viivästyä. Tulosta ei voida vastata lainkaan. Muu analytiikka viivästyy mittavan selvitystyön vuoksi.							2	Varmistetaan ennen pipetointia, että oikea laimennos menee oikeaan kaivoon. Monikanavapipetillä pipetoimissa riski pienenee, sillä kaikki näytteet siirretään kerralla.	Jos esiliedot eivät vastaa metylaatiotutkimuksen tulosta, riskiä on syytä epäillä. Tutkimuksen uusiminen eristystä DNA:sta.
1.	Pipetointivirheet / väärä määrä reagenssia pipetoidaan näytteeseen	Riippuu missä vaiheessa virhe tapahtuu; esimerkiksi pesupuskuria liiallinen määrä ei välttämättä aiheuta vahinkoa, liian vähäiset määrät aiheuttavat isomman vahingon							6	Varmistetaan ennen pipetointia oikeasta reagenssista ja oikeasta määrästä työohjeesta.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen riippuen pipetointivirheen vakavuudesta.
2.	Väärä konversio-PCR-ohjelma	Tutkimusta ei pystytä tekemään, tai tuloksen saaminen viivästyy.							2	Huolelliset työtavat, työohjeen noudattaminen, perehdytys. Vakioitu, yksiselitteisesti nimetty, valmis PCR-ohjelma PCR-laitteessa. Tarkistetaan PCR-ohjelma työohjeesta (lämpötila sekä aika).	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
4.4.4.8. 5.4. 6.3.6.6.	Supernatantin virheellinen poistaminen	Magneettihelmipelletit hajoaa. DNA:ta menetetään, näyte voidaan joutua uusimaan.							2	Huolelliset työtavat, työohjeen noudattaminen, perehdytys. Varmistetaan, ettei pipetin kärki koske pellettiin supernatanttia poistaessa. Tarkistetaan kirjasta ettei siinä ole magneettihelmiä ennen kuin supernatantti heitetään pois.	Jos helmet havaitaan pipetin kärjessä, pipetoidaan supernatantti takaisin näytteeseen ja uusitaan inkubaatioaika magneetilla.
4.6.	Pesupuskurin ei ole lisätty etanolilla	Pesupuskurin ei toimi, tutkimus joudutaan uusimaan.							4	Tarkistetaan, että pesupuskurin lisätty etanolilla tutkimuksen esivalmisteluvaiheessa. Pulloon merkitään etanolin lisäyspäivämäärä.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
4.6. 5.1. 6.1.6.4. 8.1.	Uudelleensuspensiointi epäonnistuvat	Magneettihelmipelletit ei suspensoidu uudestaan kunnolla. Työvaiheesta riippuen seuraukset vaihtelevat. Desulfonoinnissa näytteet eivät desulfonoidu eikä konversio onnistu. Pesuvaiheessa näytteisiin jää muita reagensseja haittaamaan tulosta. Eluointivaiheessa magneettihelmistä ei eluoidu DNA:ta.							2	Huolellinen resuspensiointi aina työvaiheen niin vaatiessa. Pipetointi ylös-alas useamman kerran kunnes seos on homogeenistä.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.

6.7.	Väärä magneettihelmien kuivausaika tai -lämpötila	Liian kuivat magneettihelmit nousevat putken pohjalta eluutiopuskuria lisäessä ja voivat lentää ympäriinsä. Liian märät magneettihelmit sisältävät pesupuskuria, joka saattaa vaikuttaa tuloksiin heikentävästi.																	Noudatetaan ohjeen kuivausaikaa ja -lämpötilaa. Tarkistetaan kuivauskena aikana helmien tilanne, etenkin kuivausajan loppua kohden.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
9.2.	Näytteiden sekaantuminen BCD-levylle pipetoitessa	Tutkimus tehdään väärästä näytteestä: potilaalle voi saada väärän tuloksen tai tuloksen saaminen ja sitä kautta hoito voi viivästyä. Tulosta ei voida vastata lainkaan. Muu analytiikka viivästyy mittavan selvitystyön vuoksi.																	Oikeasta näytteestä varmistuminen BCD-levylle pipetoitessa. Näytteiden pipetointi samassa järjestyksessä kuin konversiolevyltä. Monikanavapipetin käyttö minimoi riskin.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Restoraatio																				
	Väärät reagenssit / väärin sulatettu	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käyttäessä. Väärin sulatetut reagenssit aiheuttavat tulosten laadun heikkenemisen.																	Varmistus oikeista reagensseista ja niiden oikeaoppisesta sulattamisesta ja sekoittamisesta työohjeesta. Huomoltava etenkin entsyymiä sisältävien reagenssien varovainen sekoittaminen.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
1.	Hybridisaatiouuni ei päällä valmiiksi	Uunin lämmityksessä kestää, jolloin seuraavien päivien aloittaminen myöhästyy.																	Perehdytys ja työohjeen noudattaminen. Käydään laittamassa hybridisaatiouuni hyvissä ajoin lämpenemään alha samassa kohdassa työn kulkua.	Ohjeistuksen mahdollinen tarkentaminen, riskin korostaminen uusille perehdytettävälle työntekijöille.
3.	Väärin tehty 0.1 M NaOH	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käyttäessä.																	Tarkistetaan työohjeesta NaOH-kantaluoksen oikea konsentraatio ja laimennohjeet.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
4.	Näytteiden sekaantuminen BCD-levyitä MIDI-levylle pipetoitessa	Tutkimus tehdään väärästä näytteestä: potilaalle voi saada väärän tuloksen tai tuloksen saaminen ja sitä kautta hoito voi viivästyä. Tulosta ei voida vastata lainkaan. Muu analytiikka viivästyy mittavan selvitystyön vuoksi.																	Varmistetaan ennen pipetointia, että oikea näyte menee oikeaan kaivoon. Monikanavapipetin käyttö minimoi riskin.	Jos virhe havaitaan välittömästi pipetoinnin jälkeen, aloitetaan amplifikaatiovaihe alusta, sillä bisulfiittikonvertioita DNA:ta riittää useampaan tutkimukseen. Jos virhe havaitaan vasta myöhemmin, tiedotetaan tuloksien käsitteijää virheestä.
8.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai pitkä sentrifugointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi. Käytetty erihdyksessä väärää kierrosnopeuden yksikköä. Väärä sentrifugi.																	Työohjeen noudattaminen.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
11.																				
19.																				
22.																				
28.																				
32.																				
35.																				
37.																				
40.																				
9.	Väärä lämpötila/inkubaatioaika Hybex-lämpöblokkilla	Merkitävästi väärä lämpötila Hybex-lämpöblokkilla voi johtaa siihen, ettei DNA restoroidu kunnolla ja työn tulokset ovat heikommat. Sama tapahtuu, jos inkubaatioaika on merkittävästi väärä.																	Varmistetaan oikea lämpötila ja inkubaatioaika työohjeesta.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
23.																				
17.	Väärä kolonnilevyn sentrifugointi	Huomattavasti liian pieniä klerroksilla tehty sentrifugointi voi jättää näytteisiin pesupuskuria, joka voi häiritä tutkimustulosta.																	Varmistetaan oikea sentrifugointinopeus ja -aika työohjeesta.	Sentrifugoidaan uudelleen työohjeen mukaan.

25.	Levyä ei siirretä välittömästi jälle Hybe-levyiltä inkuboinnin jälkeen	Näytteiden nopea jäädyttäminen on tärkeää tulosten kannalta. Jos näytteitä ei välittömästi siirretä jälle inkuboinnin jälkeen, se voi vaikuttaa heikentävästi tutkimuksen tuloksiin.								Siirretään näytteet jälle kuten työohje sanoo. Oletetaan jäät valmiiksi edellisen inkuboinnin aikana.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Painotetaan perehdytyksessä kriittisten työvälineiden merkitystä. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
30.	Väärä amplifikaatio-ohjelma PCR-laitteesta	Väärä amplifikaatio-ohjelma voi johtaa siihen, ettei DNA restoroidu kunnolla ja työn tulokset ovat heikkomat.								Varmistetaan oikea amplifikaatio-ohjelma työohjeesta ja tarkistetaan ohjelma PCR-laitteesta.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Amplifikaatio											
4.	Näytteiden sekaantuminen MSA4-levylle pipetoidessa	Tutkimus epäonnistuu väärä reagensseja käytettäessä. Väärin sulatetut reagenssit aiheuttavat tulosten laadun heikkenemisen.								Varmistus oikeista reagensseista ja niiden oikeaoppisesta sulattamisesta ja sekoittamisesta työohjeesta. Huomoitava etenkin entsyymiä sisältävien reagenssien varovainen sekoittaminen.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
7.	Väärä vortekointi	Tutkimus tehdään väärästä näytteestä: potilaalle voi saada väärän tuloksen tai tuloksen saaminen ja sitä kautta hoito voi viivästyä. Tulosta ei voida vastata lainkaan. Muu analytiikka viivästyy mittavan selvitystyön vuoksi.								Varmistetaan ennen pipetointia, että oikea näyte menee oikeaan kaivoon. Monikanavapipetillä pipetoimassa riski pienenee, sillä kaikki näytteet siirretään kerralla.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
7.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai liian hiljainen vortekointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.								Varmistetaan oikea vortekointinopeus ja -aika työohjeesta.	Vorteksoidaan uudelleen työohjeen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
10.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai pitkä sentrifugointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.								Varmistetaan oikea sentrifugointinopeus ja -aika työohjeesta.	Sentrifugoidaan uudelleen työohjeen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
11.	Väärä pipetointijärjestys	Väärä pipetointijärjestys johtaa todennäköisesti tutkimuksen epäonnistumiseen. Valmistaja painottaa protokollissaan oikean pipetointijärjestyksen merkitystä.								Varmistetaan oikea pipetointijärjestys työohjeesta. Asettele reagenssit pöydälle oikeaan järjestykseen ja aina kun reagenssia on käytetty siirrä se syrjään.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
14.	Väärä inkubaatioaika / lämpötila hybridisaatioomissa	Väärä hybridisaatioonin lämpötila ja/tai inkubaatioaika vaikuttaa heikentävästi tuloksiin.								Varmistetaan työohjeesta oikea lämpötila inkubaatioon. Tehdään työ ripeästi mutta huolellisesti, jotta näytteet saadaan inkuboitumaan ajoissa. Aloetaan seuraava päivä myöhemmin jos inkubaation aloitus venyy, minimi-inkubaatioajasta ei poiketa.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.

Työvaihe	Riski	Riskin kuvaus	Riskin toteutumisen todennäköisyys			Toteutuneen riskin vakavuus			Kokonais-riskiluku	Ennaltaehkäisevät toimenpiteet	Korjaavat toimenpiteet, jos riski on toteutunut
			pieni	keskisuuri	suuri	pieni	keskisuuri	suuri			
Fragmentaatio											
PÄIVÄ 3											
1.	Väärät reagenssit / väärin sulatettu	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käytettäessä. Väärin sulatetut reagenssit aiheuttavat tulosten laadun heikkenemisen.							2	Varmistus oikeista reagensseista ja niiden oikeaoppisesta sulattamisesta ja sekoittamisesta työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.	Väärä inkubaatioaika / lämpötila hybridisaatioissa	Väärä hybridisaatioonin lämpötila ja/tai inkubaatioaika vaikuttaa heikentävästi tuloksiin.							2	Varmistetaan työhöjheesta oikea lämpötila inkubaatioon. Tehdään työ ripeästi mutta huolellisesti, jotta näytteet saadaan inkuboitumaan ajoissa. Aloitetaan seuraava päivä myöhemmin jos inkubaation aloitus venyy, minimi-inkubaatioajasta ei poiketa.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
7.	Väärä vorteksointi	Huomattavasti liian kova tai liian hiljainen vorteksointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.							1	Varmistetaan oikea vorteksointinopeus ja -aika työhöjheesta.	Vorteksoidaan uudelleen työhöjheen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
7.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai pitkä sentrifugointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.							1	Varmistetaan oikea sentrifugointinopeus ja -aika työhöjheesta.	Sentrifugoidaan uudelleen työhöjheen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
8.	Väärä lämpötila/inkubaatioaika Hybex-lämpöblokkilla	Merkittävästi väärä lämpötila Hybex-lämpöblokkilla voi johtaa siihen, ettei DNA fragmentoidu ja työ epäonnistuu. Sama tapahtuu, jos inkubaatioaika on merkittävästi väärä.							2	Varmistetaan oikea lämpötila ja inkubaatioaika työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Presipitaatio											
1.	Väärät reagenssit / väärin sulatettu	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käytettäessä. Väärin sulatetut reagenssit aiheuttavat tulosten laadun heikkenemisen.								Varmistus oikeista reagensseista ja niiden oikeaoppisesta sulattamisesta ja sekoittamisesta työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
5.	Väärä vorteksointi	Huomattavasti liian kova tai liian hiljainen vorteksointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.							2	Varmistetaan oikea vorteksointinopeus ja -aika työhöjheesta.	Vorteksoidaan uudelleen työhöjheen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
6.	Väärä lämpötila/inkubaatioaika Hybex-lämpöblokkilla	Merkittävästi väärä lämpötila Hybex-lämpöblokkilla voi johtaa siihen, ettei DNA fragmentoidu ja työ epäonnistuu. Sama tapahtuu, jos inkubaatioaika on merkittävästi väärä.							1	Varmistetaan oikea lämpötila ja inkubaatioaika työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
6.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai pitkä sentrifugointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.							2	Varmistetaan oikea sentrifugointinopeus ja -aika työhöjheesta.	Sentrifugoidaan uudelleen työhöjheen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
11.	Liian lyhyt inkubaatioaika jäähdyttävässä fuugissa	Liian lyhyt inkubaatioaika jääkaapissa voi johtaa siihen, ettei DNA saostu kunnolla ja tutkimus joudutaan uusimaan.							1	Varmistetaan oikea inkubaatioaika työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
									2	Varmistetaan oikea inkubaatioaika työhöjheesta.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.

12.	Väärä kylmäsentrifugointi	Väärä sentrifugointiaika ja -lämpötila voi johtaa siihen, ettei sininen pelletti ei muodostu sentrifugoinnin aikana.								Varmistetaan oikea sentrifugointiaika ja -lämpötila työhöjeesta	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
16.	Supernatantin poisto DNA-pellettistä ei onnistu	Supernatantin poistossa liian kevyt levyyn koputtelu pyörittää vasten jättää supernatantia näytteisiin, jolloin uudelleensuspensioinnissa näytteessä on epäpuhtauksia. Liian raju koputtelu voi johtaa pelletin irtoamiseen. Levyyn koputtelu samaan kohtaan voi johtaa kontaminaatioon. Kaikki vaihtoehdot voivat johtaa tutkimuksen uusimiseen.								Tarpeeksi napakka koputtelu pyörittää vasten varmistuen siitä, että levyyn siirtää aina uuteen kohtaan. Katso, ettei pellett lähde liikkeelle koputtelun aikana.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
19.1.	Pellettejä ylikuivataan	Ylikuivatut pelletit on valkeaa resuspensoida ja voi johtaa heikentyneisiin tuloksiin								Pellettejä kuivataan ohjeen mukainen aika. Kuivauksen aikana varmistetaan, ettei pellett ole ylikuivuneita tarkastamalla niitä etenkin kuivauksen loppuaikana	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Uudelleensuspensiointi											
	RA1 ei sulanut kummolla uudelleensuspenssaatioon	RA1-reagenssi on kiteinen ennen pipetointia. Voi johtaa tutkimuksen epäonnistumiseen.								Suljetaan RA1 huolella ja sekoitetaan huolella ennen pipetointia.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.	Foliolla sinetöidessä polttaa sormet	Tutkimus keskeytyy henkilövahingon vuoksi.								Lämpösinetöijän (+170°C) kanssa huolellinen työskentely. Käytössä sinetöijää levy asetetaan pidikkeeseen varovasti nostamatta käsiä läheltäkään kuumaa kannen alapintaa. Sinetöijää käsitellään vain siihen tarkoitettua kahvasta. Kun sinetöijää ei tarvitse se sammutetaan.	Hoidetaan mahdolliset henkilövahingot.
3.	Väärä inkubaatioaika / lämpötila hybridisaatiouimissa	Väärä hybridisaatiouimin lämpötila ja/tai inkubaatioaika vaikuttaa heikentävästi tuloksiin.								Varmistetaan työhöjeesta oikea lämpötila ja aika inkubaatioon	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen
5.	Väärä vorteksointi	Huomattavasti liian kova tai liian hiljainen vorteksointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.								Varmistetaan oikea vorteksointinopeus ja -aika työhöjeesta.	Vorteksoidaan uudelleen työhöjeen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
6.	Väärä sentrifugointi	Huomattavasti liian kova tai pitkä sentrifugointi voi vaikuttaa tutkimustuloksiin heikentävästi.								Varmistetaan oikea sentrifugointinopeus ja -aika työhöjeesta.	Sentrifugoidaan uudelleen työhöjeen mukaan. Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua.
7.	DNA-pelletti ei resuspensoitunut kummolla	Huolimaton resuspensointi voi johtaa siihen, että tutkimus epäonnistuu, sillä DNA ei hybridisoidu kummolla mikrosirulle.								Varmistetaan, että DNA pelletti on täysin resuspensoitunut. Tarvittaessa uusitaan vorteksointi ja sentrifugointi.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Hybridisaatio BeadChipille											
2.1.	Väärä lämpötila/inkubaatioaika Hybex-lämpöblokkilla	Merkittävästi väärä lämpötila Hybex-lämpöblokkilla voi johtaa siihen, ettei DNA fragmentoidu ja työ epäonnistuu. Sama tapahtuu, jos inkubaatioaika on merkittävästi väärä.								Varmistetaan oikea lämpötila ja inkubaatioaika työhöjeesta	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen

2.2.	Lämpölevyitä poistaessa polttaa sormet	Tutkimus keskeytyy henkilövahingon vuoksi.								Näytelevy on kuuma (+95°C) denaturaation jälkeen. Hybex-lämpölevyitä poistaessa ota näytelevy paperin mukassa tai patahanskollia työpöydälle.	Hoidetaan mahdolliset henkilövahingot.
3.	Väärin kasattu hybridisaatiokammio	Väärin kasattu hybridisaatiokammio johtaa siihen, ettei DNA hybridisoidu mikrosiruille kunnolla ja tutkimus joudutaan uusimaan.							6	Varmistetaan oikea kasaustapa työohjeesta.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
5.1.	Työntekijä koskee mikrosiirin aktivisilin kohtiin	Mikrosiru vaurioituu tai siihen jää jalkia ja tutkimus joudutaan uusimaan.							4	Varmistetaan siitä, että mikrosiuria kasitelllessä kosketaan vain reunoihin tai viivakoodin alueelle.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
5.3.	Näytteen pipetointi mikrosiruille epäonnistuu	Näytettä ei mene mikrosiruille oikeaa määrää tai näyte leviää ympäröiviin näytekaivoihin. Tutkimus joudutaan uusimaan.							4	Huolellinen pipetointi mikrosiruille. Pipetoidaan näyte hitaasti näytekaivoon työohjeen mukaisesti ja odotetaan, että se imeytyy muovin ja siun väliin. Lisätään näyteisiin lopuksi 5 µl ylimääräistä, jotta näytteet eivät pääse haihtumaan inkuboinnin aikana	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
6.5.	Väärä inkubaatioaika / lämpötila hybridisaatiouunissa	Väärä hybridisaatiouunin lämpötila ja/tai inkubaatioaika vaikuttaa heikentävästi tuloksiin.							4	Varmistetaan työohjeesta oikea lämpötila inkubaatioon. Tehdään työ ripeästi mutta huolellisesti, jotta näytteet saadaan inkuboitumaan ajoissa. Aloitetaan seuraava päivä myöhemmin jos inkubaation aloitus venyy, minimi-inkubaatioajasta ei poiketa.	Kirjataan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti haikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
7.	Esvaimistelut seuraavalle päivälle jäävät tekemättä	Esvaimistelut joudutaan tekemään seuraavan päivän alussa. Työ viivästyy.							2	Muistetaan tehdä esvaimistelut seuraavalle päivälle lopuksi. Mitataan etanoli XC4-iliukokseen huolella.	Pydetään tuuraaja tai tehdään esvaimistelut heti aamulla seuraavana päivänä.

Työvaihe	Riski	Riskin kuvaus	Riskin toteutumisen todennäköisyys		Toteutuneen riskin vakavuus			Ennaltaehkäisevät toimenpiteet	Korjaavat toimenpiteet, jos riski on toteutunut
			pieni	keskisuuri	suuri	pieni	keskisuuri		
PÄIVÄ 4									
Post-PCR esivalmistelut ja mikrosiirun pasu									
1.1.	Väärät reagenssit / väärin sulatettu TE Flow-laitte ei oikein käynnistetty. Laitteesta ei ole poistettu mahdollisia ilmakuplia työohjeiden mukaisesti, jolloin laite ei lämpene tasaisesti.	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käytettäessä. Väärin sulatetut reagenssit aiheuttavat tulosten laadun heikkenemisen.					2	Varmistus oikeista reagensseista ja niiden oikeaoppisesta sulattamisesta ja sekoittamisesta työohjeesta.	Kinjetaan ylös virhe, jotta voidaan selvittää myöhemmin mistä mahdollisesti heikko tutkimustulos voi johtua. Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
1.2.	Mikrosiirun kostetaan poistaessa se hybridisaatiokammioista tai poistaessa suojamuovia siitä	Koko ekstensio- ja värjäys epäonnistuu ja tutkimus joudutaan uusimaan.					2	Huolellinen TE Flow-laitteen käynnistäminen. Kämmelään ilmakuplat pois ennen vesikierron ja lämmityksen kytkemistä päälle. Mirataan lämpötila useasta näytekohdasta ja lopuksi lämpömittari asetetaan näytteen vierelseen kohtaan. Varmistetaan, että mitattu lämpötila eroaa vain $\pm 0.5^\circ\text{C}$ halutusta.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.1.	Mikrosiirun kastetaan poistaessa se hybridisaatiokammioista tai poistaessa suojamuovia siitä	Mikrosiirun vaurioituu tai siihen jää jälickä ja tutkimus joudutaan uusimaan.					4	Varmistetaan siltä, että mikrosiirua kastellessa kosketaan vain reunoihin tai viivakoodin alueelle.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.2.- 2.5.	Mikrosiirun pestään huolimattomasti ja mikrosiirun jää limaa suojamuovista	Ekstensio- ja värjäysreagenssit eivät sitoudu huolimattomasti pestyyn siirun kunnolla. Jos mikrosiirun jää limaa, läpivirtauskammio ei ole tiivis, jolloin ei myöskään ekstensio- ja värjäysreagenssit sitoudu kunnolla.					4	Mikrosiirun pestään huolellisesti ohjeiden mukaan. Mikrosiirun tarkistetaan mahdollisten limajäämien varalta ja ne poistetaan huolellisesti ja varovasti ohjeiden mukaisesti.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
3.	Läpivirtauskammio kasataan väärin	Väärin kaattu läpivirtauskammio ei ole tiivis, jolloin ei myöskään ekstensio- ja värjäysreagenssit sitoudu kunnolla.					4	Läpivirtauskammio kasataan tarkasti ohjeiden mukaisesti. Jos kammion kasauksessa on epäselvyyksiä, kysytään kasaukseen apua osaavalta henkilöltä.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
Ekstensio ja värjäys									
2.	Väärä pipetointijärjestys	Väärä pipetointijärjestys johtaa todennäköisesti tutkimuksen epäonnistumiseen. Valmistaja painottaa protokollassaan oikean pipetointijärjestyksen merkitystä.					4	Varmistetaan oikea pipetointijärjestys työohjeesta. Asettele reagenssit pöydälle oikeaan järjestykseen ja aina kun reagenssia on käytetty siirrä se syrjään.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.5.	Väärin valmistettu 95 % formamidi/1 mM EDTA	Tutkimus epäonnistuu väärää reagenssia käytettäessä.					4	Varmistetaan, että 95 % formamidi/1mM EDTA-liuos on tehty ohjeiden mukaisesti oikeista kantaliuoksista.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.
2.7.	Lämpötila unohtetaan vaihtaa STM-putken mukaiseksi	Mikrosiirun värjäys todennäköisesti epäonnistuu ja tutkimus joudutaan uusimaan.					2	Varmistetaan oikea lämpötila STM-putken kyljessä joka kerta, sillä lämpötila voi vaihdella eri LOT-numeroitten välillä.	Tutkimuksen mahdollinen uusiminen.

	Tutkimuksen laatuparametrit eivät täyty	Potilaan hoito voi viivästyä.									Laatuparametrien tarkastelu. Poikkeamat laatuparametreissa voivat johtua joko liian pienestä DNA-määrästä, huomattavasti suositeltua matalammasta tuumorisoluprosentista, näytteen laadusta tai laboratorioteknisistä syistä. Mikäli havaitaan laboratorioteknisiä ongelmia, annetaan mahdollinen uusintaperusteisuus.	Lausunossa mainitaan, jos laatuparametrit eivät ole täytyneet, ja tämän mahdollinen vaikutus luokittelijan antamaan tulokseen tai kopiolukuanalyysiin. Mahdollinen uusintanäytteen pyytäminen.
	Virheellinen lausunto jäteti tuloksen tulkinta, näyttesekaannus	Lähetettävä patologi voi antaa virheellisen tutkimustuloksen perusteella väärän diagnoosin jäteti hoito voi viivästyä.									Tulkintoja antavan henkilökunnan pätevyyden ylläpito. Ajantasaisen tietolähteiden hyödyntäminen tutkimisissa. Virhe- ja epävarmuustekijöiden ymmärtäminen ja poissulkeminen, mikäli mahdollista. Luokittelijaan syötetään aina kaksi näytteen otetta ja näytteet syötetään numerojärjestyksessä. Analysoidaan yksi potilas kerrallaan. Luokittelijan antamaa tulosta verrataan esitietoihin ja mahdollisesti HE-lasiin.	Toistetaan tutkimus, tarvittaessa pyydetään uusi näyte. Jos tutkimusvastaus on jo annettu, kirjoitetaan korjaava/täydentävä raportti ja ollaan yhteydessä lähettävään yksikköön. Korvaavan lausunnon antamiseen on työohje laboratorion intrassa.
	Luokittelualgoritmi ei toimi	Potilaan diagnoosi voi viivästyä.								3	Analyysin uudelleenkäynnistäminen, jos luokittelija on juuttunut. Jos luokittelijastuvosto on kokonaan pois käytössä, odotetaan kunnes se on jälleen toiminnassa.	
										6		